

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle (LMD)

Spécialité : **BIOCHIMIE**  
Option : **Biochimie Appliquée**

**Intitulé**

**L'effet protecteur d'un antioxydant naturel contre le stress oxydatif induit par le nitrate d'ammonium chez les rats**

**Présentée par: M<sup>lle</sup> MESSAADIA Amira**

**Directeur de thèse : SAKA Saad**

**Professeur, Université d'Annaba**

**Membre de Jury:**

**Président KECHRID Zine**

**Prof Université BADJI M - Annaba**

**Examineur ABDENNOUR Cherif**

**Prof Université BADJI M - Annaba**

**Examineur NECIB Youcef**

**Prof Université MENTOURI - Constantine**

**Examineur .LALAOUI Korrichi**

**Prof Université MENTOURI - Constantine**

**Année universitaire: 2013/2014**





## *Remerciements*

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant pour m'avoir donné la force et la patience*

*Ma première pensée va tout naturellement à mon encadreur, professeur Saad. Saka, qui m'a fait l'honneur de veiller et diriger ce travail. J'ai beaucoup apprécié sa confiance et sa grande disponibilité, ses conseils pertinents m'ont permis de mener à terme ce projet.*

*Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury de thèse les professeurs : «Kechrid Zine, Abdennour Cherif, Necib Youcef et Lallalaoui Korrichi » d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

*J'exprime ma profonde gratitude au professeur Mouhamed Saleh Boulaakoud, pour l'aide précieuse et l'accueil chaleureux qu'il m'a apporté au sein du laboratoire d'écophysiologie animale dont il est responsable.*

*Je ne remerciais jamais assez les ingénieurs du laboratoire écophysiologie animale « Rym Benchikh & Taher » pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements au professeur Rachid Djafer pour sa contribution et son aide concernant la réalisation du dosage de la méthémoglobine au niveau du laboratoire de toxicologie à l'hôpital Ibn Sina dont il est responsable.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire d'Anatomie pathologie à l'hôpital Ibn Rochd pour l'aide considérable qu'ils m'ont apporté dans la réalisation des coupes histologiques. Qu'ils trouvent ici ma sincère gratitude.*

*Mes sentiments de reconnaissance s'adressent à mon binôme dans la réalisation de la partie pratique, M<sup>lle</sup> Meriem Krim. Qu'elle trouve ici mes plus vifs remerciements.*

*Je remercie mes collègues et mes amis tous particulièrement « Wided & Nassou, Meriem, Sihem, Ibtissem, Hakima, Amina Bouzitouna » pour leur soutien et tous les sympathiques moments partagés et ceux à venir.*

*Enfin, je voudrais rendre hommage aux êtres les plus chers à mes yeux, ceux qui seront éternellement à mes côtés : ma mère, mes sœurs, mes frères, zizou, bétita & nina. Je tiens à ce qu'ils sachent que leurs encouragements sont une part importante de la réussite de mes études. Je vous dédie ce travail.*

*Il me reste à remercier mes amis à quatre pattes, mes adorables rats (Bechboucha), sans eux cette thèse n'aurait pas été accomplie.*

*J'ai certainement oublié des gens, involontairement je vous l'assure, la réalisation d'une thèse de Doctorat a un effet désastreux sur ma mémoire.*





*Je dédie cette thèse à mon défunt père Mr. Brahim Messaadia qui a été le premier à m'encourager pour aller si loin dans les études. Il m'a appris le goût du travail, et de l'ambition. Parce que tu m'avais toujours soutenu, sans avoir pu en voir l'aboutissement.*

*Je te dédie ce travail pour que tu sois fier de moi. Merci papa, merci pour tout*



## *Rappels*

*Ce présent mémoire témoigne du fruit des années d'études en doctorat troisième cycle L.M.D. option «Biochimie Appliquée». Une partie des résultats rapportés dans ce mémoire a donné lieu à la publication citée ci-dessous, Le second article est en cours de réalisation.*

### **Publications**

**Messaadia A.**, Saka S., Krim M., Maida I., Aouacheri O., Djafer R. Ginger-supplemented diet ameliorates ammonium nitrate-induced oxidative stress in rats. *African Journal of Biothechnology* 2013 ; 12(40) : 5909 - 5916.

Un autre article a constitué un travail de groupe :

Krim M., **Messaadia A.**, Maida I., Aouacheri O., Saka S. Protective effect of ginger against toxicity induced by chromate in rats. *Annales de Biologie Clinique* 2013 ; 71 (2) : 165 - 173.

### **Participations**

#### **Communication orale**

23<sup>ème</sup> Forum des sciences biologiques et de biotechnologie organisés par l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB). Hammamet, 21-23 Mars 2012.

#### **Communication par poster**

Les 3<sup>èmes</sup> journées scientifiques organisées par l'Association Tunisienne de Toxicologie (ATT). Tabarka, 3-5 Février 2012.

---

**Résumé**

**Objectif :** Le but de notre étude est d'évaluer l'efficacité du gingembre à restaurer le déséquilibre métabolique induit par le nitrate d'ammonium. **Matériels et méthodes :** 50 rats mâles de genre *Albinos wistar* ont été répartis en 5 groupes de 10 rats chacun, ils ont subi un traitement par le nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) et/ou une diète contenant 2 % de gingembre pendant 30 jours (N mg/kg + G). Lot 1 : témoin (0+0) ; lot 2 : les rats reçoivent 2 % du gingembre additionné au régime alimentaire (0+G) ; lot 3 : les rats sont mis sous 400 mg/kg de nitrate d'ammonium par gavage oral (*per os*) (N+0) ; lot 4 : les rats ont été traités par combinaison de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et 2 % de gingembre (N+G) ; lot 5 : ce dernier groupe est traité par une dose plus élevée de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (600 mg/kg) avec l'addition de 2 % de gingembre dans leurs régimes alimentaires ( $\text{N}^* + \text{G}$ ). **Résultats :** la toxicité du nitrate d'ammonium s'est traduite par une élévation des paramètres biochimiques : glycémie, acide urique, urée, créatinine, cholestérol, triglycéride, lipides totaux, transaminases (ASAT, ALAT), phosphatase alcaline (PAL), lactate déshydrogénase (LDH), bilirubine totale et directe. A noter aussi un trouble dans la formule de numération sanguine (FNS) et une augmentation du taux de méthémoglobine. L'implication du nitrate d'ammonium dans le stress oxydant est confirmée par une augmentation significative de la MDA et la glutathion s- transférase (GSH-ST), une réduction significative de l'activité de glutathion peroxydase (GSH-Px) et la catalase (CAT) et un effondrement du glutathion réduit (GSH) au niveau des tissus étudiés. Sur le plan histologique, la microscopie optique révèle une altération du parenchyme hépatique et une atteinte tubulaire et vasculaire sévère accompagnée d'une dégénérescence des glomérules rénaux. Le rajout du gingembre dans la diète a permis de rétablir les paramètres biologiques à leurs valeurs normales en comparaison avec le groupe témoin. L'effet cytoprotecteur est démontré par un rétablissement des dommages cellulaires observés précédemment. **Conclusion :** le gingembre est alors considéré comme une plante médicinale possédant plusieurs effets bénéfiques : hypoglycémiant, hypolipémiant, hépatoprotecteur, néphroprotecteur et surtout antioxydant.

**Mots clés :** nitrate d'ammonium, toxicité, gingembre, antioxydant, stress oxydant, rats

**Abstract**

**Objective:** the present study was designed to evaluate the capacity of ginger to restore metabolic disorders induced by ammonium nitrate. **Materials and Methods:** 50 male rats (*Albinos wistar*) were divided into 5 groups; they underwent an oral treatment of ammonium nitrate  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  and/or 2 % of ginger diet (N mg/kg body weight + G) during 30 days. Group 1 served as control (0+0) ; group 2 received a diet with 2 % of ginger (0+G) ; group 3 received a toxic dose of ammonium nitrate (400 mg/kg) and normal diet (N+0) ; group 4 received a toxic dose of ammonium nitrate and a diet containing 2 % of ginger (N+G) ; group 5 received a highly toxic dose of ammonium nitrate (600 mg/kg) and an experimental diet containing 2 % ginger (N\*+G). **Results:** the treatment by ammonium nitrate was found to elicit a rise in blood biochemical parameters: glucose, uric acid, urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, total lipids, aminotransferase (AST, ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), total and direct bilirubin. Note also a disorder in the complete blood count (CBC) and an increase in methemoglobin. In addition, the involvement of ammonium nitrate in oxidative stress was indicated by an increase in MDA level, glutathione S-transferase (GSH-ST) activity and decrease in glutathione (GSH) level, in glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) activities in the studied organs. Histological study revealed alteration in hepatocytes and severe tubular and vascular impairment accompanied by degeneration of renal glomerulus. Feeding ginger supplemented diets restored all the parameters compared to the controls group. **Conclusion:** the ginger is considered as a medicinal plant with several beneficial effects: hypoglycemic, lipid-lowering, hepatoprotective, nephroprotective and especially antioxidant.

**Key words :** Ammonium nitrate, toxicity, oxydative stress, ginger, antioxydant, rats

## الملخص

الهدف: يمثّل الهدف الرئيسي من هذه الدراسة في تقييم فعالية الزنجبيل لإصلاح الاضطرابات الأيضية الناجمة عن تترات الأمونيوم. المواد و طرق العمل: تم تقسيم 50 جرد ذكر أبيض من جنس (*Albinos wistar*) إلى 5 مجموعات، كل مجموعة تحتوي على 10 جردان، و التي أخضعت للمعالجة بتترات الأمونيوم ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) و/أو حمية تحتوي على 2 % من الزنجبيل لفترة دامت 30 يوما. المجموعة الأولى: استعملت كشاهد (0+0)، المجموعة الثانية: فئران تلقت 2 % من الزنجبيل في النظام الغذائي (0+G). المجموعة الثالثة: فئران عوملت بجرعة 400 مغ/كغ من تترات الأمونيوم عن طريق الفم (N+0). المجموعة الرابعة: فئران عوملت بتترات الأمونيوم و نظام غذائي يحتوي 2 % من الزنجبيل (N+G). المجموعة الخامسة: عوملت هذه الأخيرة بجرعة أعلى من تترات الأمونيوم (600 مغ/كغ) بالإضافة إلى نظام غذائي يحتوي 2 % من الزنجبيل (N\*+G). النتائج: أدت المعاملة بتترات الأمونيوم إلى اضطرابات بيولوجية يمكن تلخيصها في ارتفاع مستوى كل من الغلوكوز، حمض اليوريك، اليوريا، الكرياتينين، الكولسترول، الدهون الثلاثية، الدهون الكلية، ناقلات الأمين (ALAT, ASAT)، الفوسفاتاز القاعدي (PAL)، اللاكتات ديهيدروجيني (LDH)، بيلروبين المباشر والكلبي. كما لوحظ أيضا اضطراب في قيم الصيغة الدموية مع ارتفاع ملحوظا في نسبة المشيموغلوبين. تم تأكيد مساهمة تترات الأمونيوم في ظهور الإجهاد التأكسدي و ذلك من خلال الزيادة المعنوية في مستوى MDA و نشاط الغلوتاثيون ترانسفيراز (GSH-ST)، و النقص المعنوي في نشاط كل من الغلوتاثيون بيروكسيداز (GSH-Px) و الكاتالاز (CAT) مع انخفاض كبير في مستوى الغلوتاثيون المختزل (GSH) في الأعضاء المدروسة. تشريحيًا، أظهرت الدراسة المجهرية تلف في حمة الكبد مع تخريب حاد للأوعية الدموية مصحوبا بتدمير الكبيبات الكلوية. إضافة الزنجبيل إلى الحمية الغذائية سمح بتحسين و استعادة في قيم المؤشرات البيولوجية المختلفة إلى قيمها الطبيعية مقارنة مع المجموعة الشاهدة. الاستنتاج: يمكن اعتبار الزنجبيل كأحد النباتات الطبية التي تملك العديد من التأثيرات المفيدة: حيث يحافظ على مستوى سكر و دهون الدم كما أنه يحمي مختلف الخلايا الحية من حدة الإجهاد التأكسدي نظرا لخاصيته المضادة للأكسدة.

الكلمات الدالة: تترات الأمونيوم، التسمم، الإجهاد التأكسدي، زنجبيل، مضاد الأكسدة، جردان

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	: Propriétés physico-chimiques du nitrate d'ammonium.	04
<b>Tableau 2</b>	: Classement des légumes en fonction de leurs teneurs en nitrate.	09
<b>Tableau 3</b>	: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.	31
<b>Tableau 4</b>	: La classification botanique de <i>Zingiber officinale</i> .	36
<b>Tableau 5</b>	: Production et zone mondiale de gingembre.	39
<b>Tableau 6</b>	: Composition moyenne pour 100 g de Gingembre.	40
<b>Tableau 7</b>	: Les principaux composants du Gingembre.	41
<b>Tableau 8</b>	: Les posologies conseillées pour le rhizome de gingembre.	46
<b>Tableau 9</b>	: Composition du régime alimentaire.	49
<b>Tableau 10</b>	: Variation du poids corporel et des rapports organo-corporels chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et /ou le gingembre pendant 30 jours.	71
<b>Tableau 11</b>	: Variation des paramètres hématologiques chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et /ou le gingembre pendant 30 jours.	75
<b>Tableau 12</b>	: Variation des paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et ou le gingembre pendant 30 jours.	79
<b>Tableau 13</b>	: Variation du taux de malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les organes (foie, reins) chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	83
<b>Tableau 14</b>	: Variation du taux de glutathion (n mol/mg protéines) chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	86
<b>Tableau 15</b>	: Variation de l'activité enzymatique de la GSH-Px ( $\mu\text{mol GSH/mg prot}$ ), GSH-ST ( $\mu\text{mol GST/min/mg prot}$ ) et la CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg prot}$ ) dans le foie et les reins des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et ou le gingembre pendant 30 jours.	89

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	: Structure du nitrate d'ammonium.	04
<b>Figure 2</b>	: Cycle d'azote dans la biosphere.	08
<b>Figure 3</b>	: Mécanismes de translocation et transformation de nitrate dans le corps humain.	13
<b>Figure 4</b>	: Catabolisme de la méthémoglobine.	17
<b>Figure 5</b>	: La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.	18
<b>Figure 6</b>	: Phosphorylation oxydative, production de superoxyde, et les voies d'élimination dans les mitochondries.	21
<b>Figure 7</b>	: Poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles.	21
<b>Figure 8</b>	: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.	26
<b>Figure 9</b>	: Lésions de l'ADN l'attaque radicalaire.	26
<b>Figure 10</b>	: Elimination des radicaux libres oxygénés et azotés et autres espèces réactives dans les cellules des mammifères.	33
<b>Figure 11</b>	: Principaux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes.	34
<b>Figure 12</b>	: La plante et le rhizome de gingembre ( <i>Zingiber officinale</i> ).	37
<b>Figure 13</b>	: Les majeurs constituants du gingembre ( <i>Zingiber Offinale</i> ).	42
<b>Figure 14</b>	: Les différentes étapes du Protocole experimental.	52
<b>Figure 15</b>	: Courbe standard pour le calcul de l'MDA.	58
<b>Figure 16</b>	: Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin.	64
<b>Figure 17</b>	: Variation du poids corporel chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	72
<b>Figure 18</b>	: Variation des rapports organo-corporels chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	73

<b>Figure 19</b>	: Variation des paramètres hématologique chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	77
<b>Figure 20</b>	: Variation de la glycémie chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et /ou le gingembre pendant 30 jours.	80
<b>Figure 21</b>	: Variation du bilan rénal « urée, créatinine & acide urique » chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	80
<b>Figure 22</b>	: Variation du bilan lipidique « lipides totaux, triglycérides & cholestérol » chez les rats témoins et traités par les nitrates d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	81
<b>Figure 23</b>	: Variation du bilan hépatique « ASAT, ALAT, PAL, LDH, BT & BD » chez les rats témoins et traités par les nitrates d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	82
<b>Figure 24</b>	: Variation du taux de MDA dans le foie et les reins des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et le gingembre pendant 30 jours	84
<b>Figure 25</b>	: Variation du taux de glutathion hépatique, rénal, intestinal, splénique testiculaire et cardiaque chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.	87
<b>Figure 26</b>	: Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) ( $\mu$ mol GSH/mg de prot) dans le foie et les reins des rats témoins et traités.	90
<b>Figure 27</b>	: Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GSH-ST) ( $\mu$ mol GST/ min / mg de prot) dans le foie et les reins des rats témoins et traités.	90
<b>Figure 28</b>	: Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ( $\mu$ mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / min / mg de prot) dans le foie et les reins des rats témoins et traités.	90
<b>Figure 29</b>	: Coupes histologiques du foie des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours « grandeur x 400 ».	92
<b>Figure 30</b>	: Coupes histologiques du rein des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours « grandeur x 400 ».	93

## *Liste des abréviations*

<b>ALAT</b>	: Alanine aminotransférase
<b>ASAT</b>	: Aspartate aminotransférase
<b>BSA</b>	: Bovin Serum Albumine
<b>CAT</b>	: Catalase
<b>CCMH</b>	: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
<b>CDNB</b>	: 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
<b>CMV</b>	: Complexe Minéro-vitaminique
<b>DTNB</b>	: Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
<b>EDTA</b>	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>ERO</b>	: Espèces Réactives de l'Oxygène
<b>GB</b>	: Globules Blancs
<b>GR</b>	: Globule rouge
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit
<b>GSH-Px</b>	: Glutathion peroxydase
<b>GSH-R</b>	: Glutathion réductase
<b>GSH-ST</b>	: Glutathion S-transférase
<b>GSSG</b>	: Glutathion oxydé
<b>Hb</b>	: Hémoglobine
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peroxyde d'hydrogène
<b>LOOH</b>	: Hydroxyde lipidique
<b>MDA</b>	: Malondialdéhyde
<b>MétHb</b>	: Méthémoglobine
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide di nucléotide phosphate
<b>NH<sub>4</sub></b>	: Ammonium
<b>NO•</b>	: Radical monoxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Nitrite
<b>NO<sub>3</sub></b>	: Nitrate
<b>OH•</b>	: Radical hydroxyle
<b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b>	: Anion superoxyde

**ONOO** : peroxyinitrite  
**PAL** : Phosphatase alcaline  
**LDH** : Lactate déshydrogénase  
**TBA** : Acide thiobarbiturique  
**TBS** : Tris-buffered saline  
**TCA** : Trichloroacétique.  
**VGM** : Volume Globulaire Moyen

# Table des matières

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION	01
--------------	----

### *Premier chapitre*

<b>1. Le nitrate d'ammonium</b> .....	04
<b>1.1. Description et propriétés physico-chimiques</b> .....	04
<b>1.2. Procédé de fabrication du nitrate d'ammonium</b> .....	05
<b>1.3. Utilisation du nitrate d'ammonium</b> .....	05
<b>1.4. Source naturelle de nitrate « Cycle d'azote »</b> .....	05
1.4.1. Fixation de l'azote atmosphérique.....	06
1.4.2. Dénitrification.....	07
<b>1.5. Le nitrate dans notre alimentation</b> .....	08
<b>1.6. Le nitrate dans l'eau de consommation</b> .....	09
<b>1.7. Biosynthèse et cinétique de nitrate dans l'organisme humain</b> .....	09
1.7.1. Biosynthèse endogène de nitrate.....	09
1.7.2. Cinétique et métabolisme de nitrate.....	09
<b>1.8. Exposition au nitrate</b> .....	14
1.8.1. Effet du nitrate sur l'environnement.....	14
1.8.1.1. Effet du nitrate sur l'atmosphère.....	14
1.8.1.2. Effet du nitrate sur le sol.....	14
1.8.1.3. Effet du nitrate sur l'écosystème aquatique.....	14
1.8.2. Effets du nitrate sur la santé humaine.....	15
1.8.2.1. Formation de la méthémoglobine.....	15
1.8.2.2. Effet cancérigène du nitrate.....	17

### *Deuxième chapitre*

<b>2. Le stress oxydant</b> .....	18
<b>2.1. Définition du stress oxydant</b> .....	18
<b>2.2. Origine du stress oxydant</b> .....	18
<b>2.3. Définition des radicaux libres</b> .....	19
2.3.1. Le radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	19
2.3.2. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).....	22
2.3.3. Radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ).....	22

2.3.4. L'anion monoxyde d'azote (NO•).....	22
<b>2.4. Potentialité toxique des espèces radicalaires.....</b>	<b>23</b>
2.4.1. La peroxydation lipidique.....	23
2.4.2. Dommages oxydatifs de l'ADN .....	25
2.4.3. Oxydation des protéines .....	27
2.4.4. Oxydation des glucides.....	27
<b>2.5. Implication du stress oxydant dans les pathologies.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Les systèmes de défenses antioxydants.....</b>	<b>28</b>
2.6.1. Les systèmes enzymatiques.....	28
2.6.2. Système non enzymatique.....	30

### *Troisième chapitre*

<b>3. Le gingembre.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Historique du gingembre.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Description botanique du gingembre.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Distribution géographique et conditionnement.....</b>	<b>38</b>
3.3.1. Exigence climatique.....	38
3.3.2. Exigence pédologique.....	38
<b>3.4. Production mondiale du gingembre.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5. Chimie de gingembre.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6. Propriétés pharmacologiques du gingembre.....</b>	<b>43</b>
3.6.1. Action au niveau du tractus gastro-intestinal.....	43
3.6.2. Action anti-nauséuse du gingembre.....	43
3.6.3. Action antilipémique et anti-athéromateuse.....	44
3.6.4. Action sur le diabète.....	44
3.6.5. Action anti-inflammatoire.....	44
3.6.6. Action sur le sang.....	45
3.6.7. Action sur le cœur et les artères.....	45
3.6.8. Actions antibactérienne, antifongique et mollucide.....	45
3.6.9. Activité anticancéreuse.....	45
<b>3.7. Effet toxicologique du gingembre.....</b>	<b>46</b>
3.7.1. Posologie.....	46
3.7.2. Attention à l'automédication.....	47

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

## *Quatrième chapitre*

<b>4. Matériels et Méthodes</b> .....	48
<b>4.1. Matériels</b> .....	48
4.1.1. Produit chimique.....	48
4.1.2. Préparation de la poudre de gingembre.....	48
4.1.3. Entretien et traitement des animaux.....	48
4.1.4. Prélèvement sanguin.....	49
4.1.5. Prélèvement de certains organes.....	50
<b>4.2. Méthodes</b> .....	53
4.2.1. Dosage des paramètres hématologiques.....	53
4.2.2. Dosage des paramètres biochimiques.....	53
4.2.2.1. Mesure de la glycémie.....	53
4.2.2.2. Mesure de l'urée.....	54
4.2.2.3. Mesure de la créatinine.....	54
4.2.2.4. Mesure de l'acide urique.....	54
4.2.2.5. Mesure du cholestérol.....	55
4.2.2.6. Mesure de triglycéride.....	55
4.2.2.7. Mesure des lipides totaux.....	55
4.2.2.8. Mesure de l'aspartate aminotransférase (ASAT / GOT).....	55
4.2.2.9. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT/GPT).....	56
4.2.2.10. Mesure de la phosphatase alcaline (PAL).....	56
4.2.2.11. Mesure du lactate déshydrogénase (LDH).....	56
4.2.2.12. Mesure de la bilirubine directe et totale.....	57
4.2.3. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	57
4.2.3.1. Mesure du malone-dialdéhyde (MDA).....	57
4.2.3.2. Mesure du Glutathion réduit (GSH).....	58
4.2.3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la (GSH-Px).....	59
4.2.3.4. Mesure de l'activité enzymatique de la (GSH-ST).....	61
4.2.3.5. Mesure de l'activité enzymatique de la (CAT).....	62
4.2.4. Dosages des protéines.....	63
4.2.5. Etude histologique.....	64
4.2.5.1. Fixation.....	64
4.2.5.2. Déshydratation.....	64

4.2.5.3. Inclusion et réalisation des blocs.....	65
4.2.5.4. Confection des coupes.....	65
4.2.5.5. Coloration et montage.....	65
<b>4.3. Analyse statistique des résultats.....</b>	<b>69</b>

### *Cinquième chapitre*

<b>5. Résultats.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1. Etude pondérale.....</b>	<b>70</b>
5.1.1. Influence du traitement sur la croissance corporelle.....	70
5.1.2. Influence du traitement sur les rapports organo-corporels.....	70
<b>5.2. Etude hématologique.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3. Etude biochimique.....</b>	<b>78</b>
<b>5.4. Influence du traitement sur la variation de paramètres du stress oxydant...</b>	<b>83</b>
5.4.1. Le malondialdéhyde (MDA).....	83
5.4.2. Le glutathion tissulaire (GSH).....	85
5.4.3. L'activité enzymatique de la GSH-Px, CAT & GSH-ST.....	88
<b>5.5. Etude histologique.....</b>	<b>91</b>

### *Sixième chapitre*

<b>6. Discussion.....</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVE.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>103</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>122</b>

---

## *INTRODUCTION*

---

## Introduction

La très forte expansion démographique que connaît actuellement la population humaine, a entraîné une explosion des systèmes de production, notamment alimentaire. Une exploitation effrénée des sols et des écosystèmes a été provoquée pour produire des quantités suffisantes afin de répondre à cette demande (Patz, 2001). L'usage massif de fertilisants a permis une augmentation des rendements agricoles, mais a entraîné une pollution accrue des eaux continentales et des terres cultivées (Koller, 2009). Le nitrate d'ammonium est un composé chimique de formule  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , principalement utilisé comme engrais azoté, sa présence en excès dans l'environnement représente un risque majeur pour la santé de l'homme, sa dispersion dans les eaux de surface et les eaux profondes est un sérieux problème environnemental qui se manifeste principalement par le phénomène d'eutrophisation (Camargo *et al*, 2005 ; Gilchrist *et al*, 2010).

La conversion du nitrate en nitrite dans la bouche est particulièrement importante, la surface dorsale de la langue héberge une flore bactérienne spécialisée dans la réduction de nitrate en nitrite (Duncan *et al*, 1995). Dans l'estomac, les nitrites déglutis se transforment en acides nitreux ( $\text{HNO}_2$ ), instable, qui se décomposent spontanément en une variété de composés azotés, essentiellement, le monoxyde d'azote (NO) et les composés N-nitrosés (Du *et al*, 2007). Le monoxyde d'azote remplit plusieurs fonctions physiologiques comme : la neurotransmission (Garthwaite, 1991), la régulation immunitaire (Hibbs, 1991), la relaxation vasculaire du muscle lisse (Moncada *et al*, 1986) et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Radomski *et al*, 1987).

Toutefois, la présence d'un électron non apparié augmente sa réactivité avec les radicaux libres provoquant par conséquent un stress oxydant. L'interaction du  $\text{NO}^\bullet$  avec l'oxyhémoglobine ( $\text{HbO}_2$ ) est à l'origine de la formation de méthémoglobine (metHb), en outre, il peut réagir avec des amines secondaires pour produire des composés N-nitrosés susceptibles d'être cancérigènes (Volkmer *et al*, 2005). Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de  $\text{NO}^\bullet$  et de superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxynitrite ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le  $\text{NO}_2$  et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Beckman *et al*, 1990). Le peroxynitrite est un oxydant cytotoxique

majeur impliqué dans un grand nombre de dommages cellulaires y compris l'inhibition des chaînes de transfert des électrons mitochondriales, ce qui génère plus de ROS (Wallace *et al*, 1998), l'oxydation des LDL se qui accroît le risque athéromateux (Pannala *et al*, 1998) etc.

Pour lutter efficacement contre les dommages oxydants, l'organisme est équipé de divers systèmes antioxydants (Koechlin-Ramonatxo, 2006). De nombreuses molécules, à savoir la ferritine, la céruloplasmine, l'albumine, et bien d'autres, permettent de chélater les métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$  /  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  /  $\text{Cu}^{+}$ ) (Yu, 1994). Dans les érythrocytes, le glutathion autrement dit thiol non protéique, est responsable d'entretenir le fer sous sa forme réduite (Jahoor *et al*, 1999). Un processus durant lequel le glutathion passe d'une forme réduite « GSH » à une forme oxydée « GSSG », cette réaction est catalysée par le glutathion peroxydase (GSH-Px). La régénération du GSH est assurée grâce au glutathion réductase (GSH-R) en présence de NADPH comme cofacteur (Hayes et McLellan, 1999). D'autres substances exogènes comme les oligoéléments et les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), les caroténoïdes (vitamine A et  $\beta$ -carotène,...), les polyphénols, apportés notamment par une alimentation riche en fruits et légumes, agissent en piégeant les radicaux libres et les transformant en molécules plus stables (Pincemail *et al*, 2002).

Depuis la nuit des temps, les hommes ont toujours utilisé les plantes pour se nourrir, se parer et se soigner. Toutefois, l'emploi des plantes médicinales a connu un rapide déclin avec l'avènement de la médecine scientifique et l'apparition des médicaments modernes. Mais, à cause des effets indésirables de ces derniers, les gens se tournent de nouveau vers les plantes médicinales. Leur popularité grandissante a amené les scientifiques à entreprendre de nouvelles recherches essayant d'identifier les principes actifs et mettent au point une nouvelle variété de médicament. Les épices sont reconnus comme sources d'antioxydants naturels qui peuvent protéger contre le stress oxydant et jouer un rôle important dans la prévention de nombreuses pathologies (Gião *et al*, 2010).

Notre étude s'est intéressé à l'une d'entre elles en l'occurrence le gingembre (*Zingiber officinale*) connu pour ces vertus médicinales (Chrubasik *et al*, 2005) et culinaires. De nombreuses investigations chimiques sur cette plante ont mené à

l'isolement et l'identification d'un grand nombre de composés biologiquement actifs, comme les gingerols, les gingerones et les shogaols (Schwertner et Rios, 2007), possédant diverses propriétés pharmacologiques : antioxydantes (Stoilova *et al*, 2007), cardiovasculaires (Nicoll et Henein, 2009), anti-inflammatoires (Grzanna *et al*, 2005) et anti-cancérigènes (Shukla et Singh, 2007).

Plusieurs essais cliniques ont démontré le pouvoir du gingembre à soulager la nausée gravidique (Ozgoli *et al*, 2009), postopératoire (chaiyakunapruk *et al*, 2006), chimiothérapique (Levine *et al*, 2008) et cinétosique (Lien *et al*, 2003), le traitement du catarrhe, du rhumatisme, les maladies nerveuses, la gingivite, le mal de dents, l'asthme, la constipation et le diabète (Ali *et al*, 2008).

## *OBJECTIFS*

*L'objectif de cette étude est d'évaluer expérimentalement les conséquences toxicologiques de l'exposition à une eau potable contaminée par les nitrates d'ammonium et étudier la potentialité du gingembre à réduire l'effet oxydant en évaluant son pouvoir antioxydant.*

*Pour cette fin, des paramètres : biochimiques, hématologiques, enzymes antioxydantes (GSH-Px, CAT, GSH-ST), glutathion réduit (GSH) et biomarqueurs du stress oxydant (MDA) ont été mesurés. Une étude histologique sur le foie et le rein est effectuée.*

---

*RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES*

---

## *Premier chapitre : Nitrate d'ammonium*

- ❖ *Description et propriétés physico-chimiques*
- ❖ *Procédé de fabrication*
- ❖ *Utilisations*
- ❖ *Sources naturelles*
- ❖ *Les nitrates dans notre alimentation*
- ❖ *Les nitrates dans l'eau de consommation*
- ❖ *Biosynthèse et cinétique de nitrate dans l'organisme humain*
- ❖ *Exposition au nitrate d'ammonium (effet sur l'environnement et la santé)*

## 1. Le nitrate d'ammonium

### 1.1. Description et propriétés physico-chimiques du nitrate d'ammonium

Le nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (figure 1) est un composé chimique, utilisé principalement comme engrais azoté, plus connu sous le nom d'ammonitrate. C'est une substance cristalline, inodore, hygroscopique tend à s'agglomérer en grumeaux, très soluble dans l'eau, soluble aussi dans l'alcool, l'acide acétique et l'acide nitrique. Le tableau 1 regroupe l'ensemble de ces propriétés physico-chimiques (Oommen et Jain, 1999).

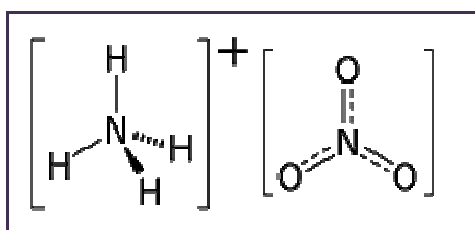


Figure 1 : Structure du nitrate d'ammonium (Tu *et al*, 2013)

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du nitrate d'ammonium (Oommen et Jain, 1999)

Propriétés	Valeur	
Formule moléculaire	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	
Masse molaire	80	g/mol
Chaleur de combustion	346	Cal/g
Chaleur de formation	1098	Cal/g
Chaleur de l'explosion	346	Cal/g
Chaleur de fusion	18,23	Cal/g
Densité	1,725	g/cm <sup>3</sup>
Couleur	Incolore	
Point de fusion	169,68	°C
Volume spécifique	0,580	cm <sup>3</sup> /g
Vitesse de détonation	1250-4650	m/s
Coefficient de dilatation thermique à 20°C	$9,82 \times 10^{-4}$	% /°C
Pression de vapeur à 205°C	7,4	mmHg

## 1.2. Procédé de fabrication du nitrate d'ammonium

Le nitrate d'ammonium est élaboré pour la première fois en 1659 par Hans Rudolf Glauber, qui l'appela « nitrum flammans » en raison de la différence entre la couleur jaune de sa flamme et celle du nitrate de potassium. Le nitrate d'ammonium est produit principalement à partir d'ammonium et d'acide nitrique selon la réaction suivante :



De nombreux procédés permettent de produire le nitrate d'ammonium. Trois grandes étapes ressortent (Oommen et Jain, 1999):

- ✓ la neutralisation de l'ammoniac par l'acide nitrique.
- ✓ l'évaporation de la solution neutralisée.
- ✓ le contrôle de la taille des particules lors de la cristallisation et des caractéristiques du produit sec.

## 1.3. Utilisation du nitrate d'ammonium

Le statut économique du nitrate d'ammonium a évolué depuis la première guerre mondiale. Auparavant, il était principalement destiné à entrer dans la composition des explosifs commerciaux et des munitions. Employé également comme explosif dans les travaux de génie civil (travaux publics, constructions), ou dans d'autres domaines de l'industrie, en particulier dans les carrières et les mines. L'ammonitrate est utilisé par les fabricants de boosters de fusées pour la conception des propulsifs à base d'asphalte fondue. Actuellement, la plus grande proportion de nitrate d'ammonium produite est utilisée comme fertilisant. Notons toutefois qu'il faut éviter l'épandage d'engrais azotés pendant l'automne et sur les sols dénudés. Les engrais azotés s'enfoncent dans le sol (20 cm/an en moyenne), sous l'effet des pluies, ce qui les rend inaccessibles aux racines des végétaux qu'ils sont censés nourrir (Testud, 2004).

## 1.4. Source naturelle de nitrate « Cycle d'azote »

Il peut paraître curieux que les plantes puissent souffrir d'une carence en azote, alors même que l'atmosphère se compose d'environ 80 % principalement sous forme N<sub>2</sub> mais aussi et à des degrés divers sous les formes NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O. Or, l'azote

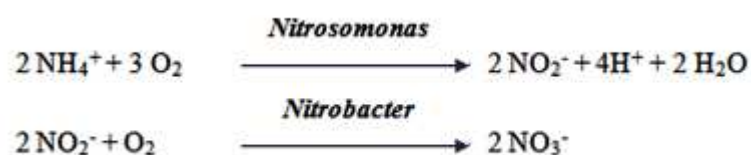
atmosphérique se trouve à l'état gazeux  $N_2$  que les végétaux ne peuvent utiliser. Il ne devient assimilable qu'après avoir été transformé en ammonium ( $NH_4^+$ ) ou en nitrate ( $NO_3^-$ ). La décomposition de l'humus par les microorganismes (y compris les bactéries ammonifiantes) constitue, à court terme, la source principale de minéraux azotés (Koller, 2009).

#### 1.4.1. Fixation de l'azote atmosphérique

La fixation se fait soit par oxydation chimique rendant cet élément susceptible d'être assimilé ; soit par l'activité de microorganismes spécialisés libres ou symbiotiques (figure 2).

❖ **L'oxydation de  $N_2$  par les éclairs des orages** : les dépôts atmosphériques constituent la première voie. Ils représentent environ 5 à 10 % de l'azote assimilable qui entre dans la majorité des écosystèmes. Dans ce processus, les éclairs provoquent une formation d'oxydes d'azote suite à une nitrification abiotique. L'acide nitrique formé se combine ultérieurement à l'ammoniac présent dans l'atmosphère et donne des microcristaux de nitrate d'ammonium qui se rabattent à la surface du sol par les précipitations sous formes de pluies ou de neiges (Ramade, 1998).

❖ **Fixation de  $N_2$  par les microorganismes libres** : cette fixation fournit en moyenne sur les continents 25 Kg d'azote par hectare et par an. Certaines étapes clés du cycle de l'azote, s'accomplissent uniquement grâce aux procaryotes. Le sol abrite plusieurs espèces de bactéries libres chimio-hétérotrophes (aérobies « *Azotobacter* » ou anaérobies « *Clostridium* » et quelque Cyanophycées « Algue bleu »), ces derniers sont les plus autonomes de tous les organismes. Elles n'ont besoin pour croître que de l'énergie lumineuse, du  $CO_2$ , du  $N_2$ , d'eaux et de quelques minéraux.



Les végétaux assimilent le nitrate libéré par les bactéries et l'incorporent à des composés organiques comme les acides aminés et les protéines. L'enzyme clé de la fixation de N<sub>2</sub> chez les procaryotes est la nitrogénase, sa structure est très complexe et n'est pas totalement déterminée (Sharma et Ahlert, 1977).

❖ **Fixation symbiotique de l'azote** : une grande partie des recherches sur la fixation symbiotique de l'azote se concentrent sur les membres de la famille des légumineuses, comme le pois, les haricots, le soja, les arachides, la luzerne et le trèfle, qui ont une très grande importance en agriculture (Geurts et Bisseling, 2002). Cette relation existant entre les espèces de légumineuses et les bactéries (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium*) collectivement appelée (*rhizobia*) est une relation mutualiste c'est-à-dire que les deux partenaires en bénéficient. Les bactéries fournissent l'azote fixé aux légumineuses, qui leur procurent quant à elles les glucides et les autres substances organiques (Lindström *et al*, 2010).

L'ammoniac (NH<sub>3</sub>) est le produit issu directement des divers processus de fixation de l'azote. Cependant, la plupart des sols sont au moins légèrement acides. Ainsi le NH<sub>3</sub> libéré dans le sol capte rapidement un proton (H<sup>+</sup>) pour former l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que les végétaux peuvent assimiler directement (Sharma et Ahlert, 1977).

#### 1.4.2. Dénitrification

La dénitrification est le phénomène inverse de la fixation de l'azote pendant lequel certaines espèces de *Pseudomonas* convertissent une quantité de nitrate en diazote qui sera ensuite renvoyée dans l'atmosphère selon la séquence suivante (Wetzel, 2001) :



La figure suivante résume le cycle d'azote dans la biosphère.

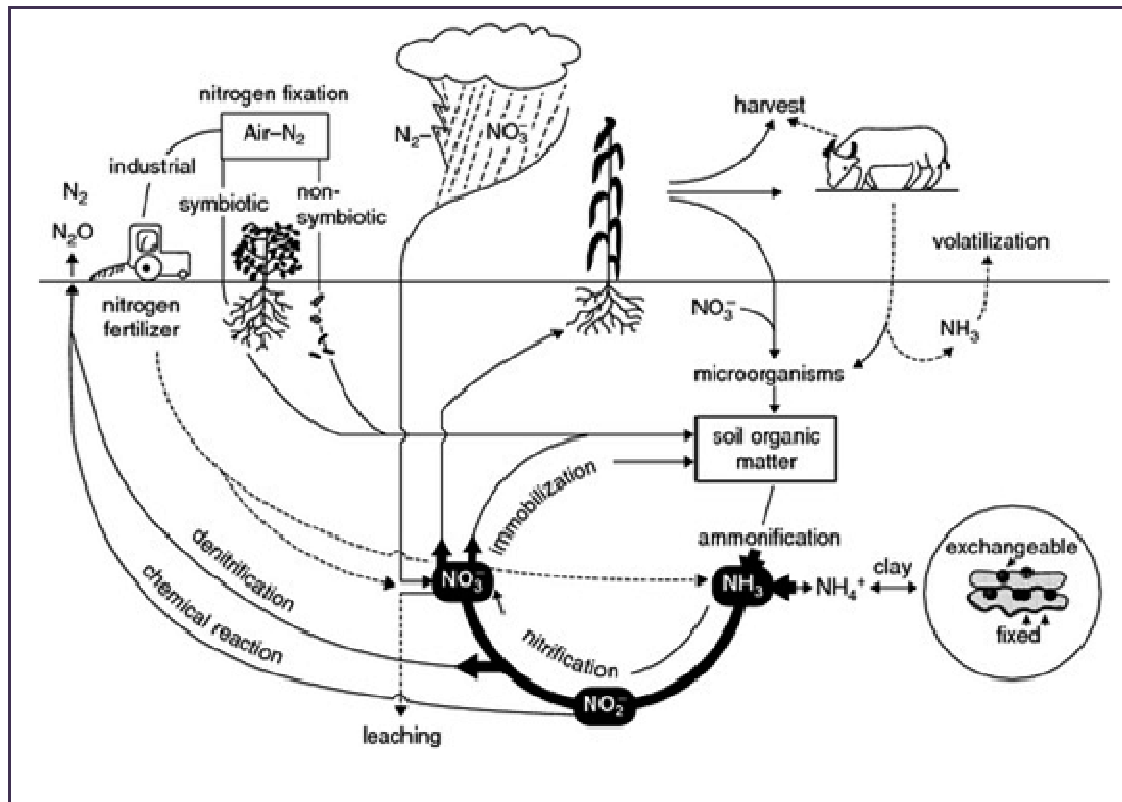


Figure 2 : Cycle d'azote dans la biosphère (Bock et Wagner, 2006)

### 1.5. Le nitrate dans notre alimentation

Les aliments, en particulier les légumes et les fruits peuvent contenir une dose élevée de nitrates (tableau 2). La teneur en nitrate est influencée par l'azote disponible dans le sol ou apporté par fertilisation, la variété cultivée et les conditions de croissance incluant la saison (les nitrates étant métabolisés en présence de lumière, les cultures sous serres ou d'hiver sont généralement plus chargées en nitrates) (Peterson et Stoltze, 1999).

Les nitrates de sodium (E251) ou les nitrates de potassium (E252) sont notoirement utilisés comme additifs alimentaires dans la production des viandes, poissons, dérivés fumés et produits laitiers. Ils contribuent grandement à stabiliser la couleur des viandes rouges, ralentir l'oxydation et exhausser la saveur, augmenter la durée de conservation en inhibant certaines détériorations et protéger le consommateur contre les risques de développement des microorganismes anaérobiques particulièrement *Clostridium botulinum* (Honikel, 2008).

**Tableau 2 :** Classement des légumes en fonction de leurs teneurs en nitrate (Peterson et Stoltze, 1999)

Groupes	Teneur mg/kg	Légumes
Groupe 1	< 200	Asperge, champignon, pomme de terre, tomate
Groupe 2	< 500	Brocoli, chou-fleur, concombre, oignon, navet
Groupe 3	< 1000	Haricot vert, chou, carotte
Groupe 4	< 2500	Endive, rhubarbe, persil, poireau
Groupe 5	> 2500	Betterave, céleri, laitue, épinard, radis

## 1.6. Le nitrate dans l'eau de consommation

De par leur forte solubilité dans l'eau, les nitrates se retrouvent souvent dans l'eau du robinet à des concentrations proches des limites autorisées. En effet, l'utilisation abusive d'engrais azotés conduit à une augmentation des teneurs en  $\text{NO}_3^-$  dans les eaux de surfaces et souterraines. Par conséquent, les teneurs élevées en azote des nappes se répercutent sur les eaux brutes utilisées pour la production d'eau potable (Mason, 1996). L'organisation mondiale pour la santé (OMS, 2003) précise 50 mg/l de nitrate dans l'eau comme la concentration maximale conseillée.

## 1.7. Biosynthèse et cinétique de nitrate dans l'organisme humain

### 1.7.1. Biosynthèse endogène de nitrate

Dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle, Mitchell *et al* (1916) observaient que les quantités de nitrate rejetées dans l'urine des mammifères pouvaient être supérieures aux quantités ingérées, ce qui permettait de suspecter une synthèse endogène de nitrate. Les recherches de Leaf *et al* (1989) ont mis en évidence une biosynthèse endogène à partir de la L-arginine.

### 1.7.2. Cinétique et métabolisme de nitrate

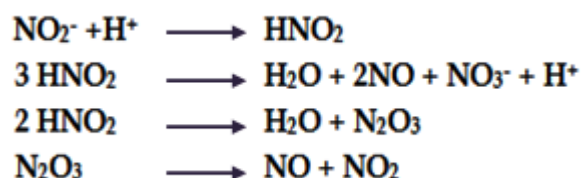
Le nitrate existe largement dans l'eau potable et la nourriture, en effet, il entre inévitablement dans la chaîne alimentaire humaine. Par conséquent, la compréhension du métabolisme de nitrate ingéré est un préalable à l'évaluation appropriée des effets nocifs et bénéfiques prévus sur la santé humaine (figure 3) (Du *et al*, 2007).

❖ **Absorption de nitrate** : chez l'homme, le nitrate ingéré est essentiellement absorbé à partir de la portion supérieure de l'appareil digestif. L'absorption est rapide, entre une et trois heures après ingestion de denrées alimentaires et boissons, plusieurs chercheurs ont observé des taux maxima de nitrates dans le sérum, la salive et l'urine (Bartholomew et Hill, 1984).

❖ **Distribution de nitrate** : le nitrate absorbé est rapidement distribué aux glandes salivaires et probablement à d'autres glandes exocrines, il peut même passer dans le lait maternel (Green *et al*, 1982). Après administration par voie intraveineuse de nitrate marqué au  $^{13}\text{N}$ , le marquage a rapidement été distribué dans tout le corps par la circulation sanguine (Witter *et al*, 1979).

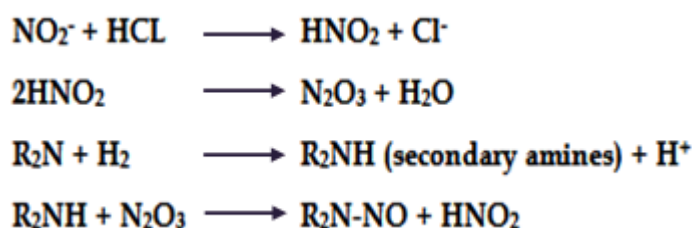
❖ **Biotransformation de nitrate** : la conversion du nitrate dans la bouche est particulièrement importante, une partie de nitrates ingérés (~ 20 %) est transformée en nitrite par les bactéries buccales, très précisément au niveau des sillons de la région postérieure de la langue (Duncan *et al*, 1995). En raison de l'absence de nitrite réductase dans la cavité buccale, une fois arrivé à l'estomac, les nitrites déglutis se transforment en acides nitreux ( $\text{HNO}_2$ ), instable, qui se décomposent spontanément en une variété de composés azotés, essentiellement, le NO et les composés N-nitrosés (Du *et al*, 2007).

✓ **Conversion en NO** : on signale que la concentration de NO formée dans l'estomac peut être augmentée relativement à la prise de nitrate. Les récentes recherches indiquent qu'il y a une corrélation significative entre la génération du NO et le contenu de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) dans le plasma (Bryan, 2006).

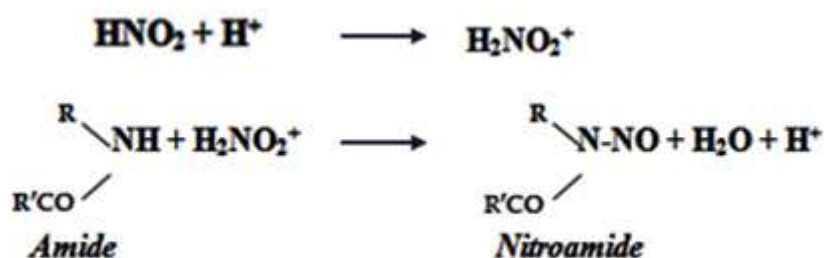


✓ **Conversion du nitrite en N-nitroso composés** : dans l'environnement acide, le nitrite peut être converti en agents nitrosant actifs, comme l'anhydride d'azote ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), le nitrosyl isothiocyanate (GN-NCS), le nitrosyl halide (NOX), et le nitrite protonic

( $\text{H}_2\text{NO}_2^+$ ). Ces composés peuvent facilement réagir avec des amines secondaires pour produire les N-nitroso composés (Bai et Sun, 2002).



La nitrosation est la réaction de substitution entre les amines secondaires et les agents nitrosants, transformant probablement un amide en un nitroamide.



Plusieurs recherches indiquent que la réaction de nitrosation est liée au pH et à la concentration en réactifs. Un pH gastrique faible (de 1 à 3) est normal chez un adulte à jeun, en un état si acide, la croissance des bactéries réductrices de nitrate est empêchée. Une fois que l'achlorhydrie a lieu, le pH gastrique augmentera et ces bactéries seront activées. De ce fait, il y aura plus de nitrite converti chez les patients souffrant d'une gastrite atrophique chronique, cancer de l'estomac ou traités avec de la cimétidine ou d'autres antiacides (Du *et al*, 2007).

Les nourrissons de moins de trois mois sont également très exposés à la réduction bactérienne du nitrate gastrique parce qu'ils produisent très peu d'acide gastrique (Ellen et Schuller, 1983). Les infections gastro-intestinales, fréquentes chez eux, peuvent entraîner une augmentation supplémentaire de la réduction du nitrate en nitrite.

❖ **Excrétion** : la demi-vie du nitrate dans le corps humain est approximativement de 5 heures après ingestion (Wagner *et al*, 1983). La majeure partie 60 à 70 % des nitrates ingérés est éliminée sous forme inchangée par voie urinaire ; le reste est excrété dans la salive, accessoirement dans la sueur et les selles (Saul *et al*, 1981). Les glandes salivaires

se comportent comme une pompe à nitrate, qu'elles accumulent par transport actif : la concentration salivaire est environ dix fois celle du plasma. Dans une étude portant sur des nourrissons, l'excrétion de nitrate urinaire se situant entre 80 et 100 % de l'absorption moyenne (Turek *et al*, 1980).

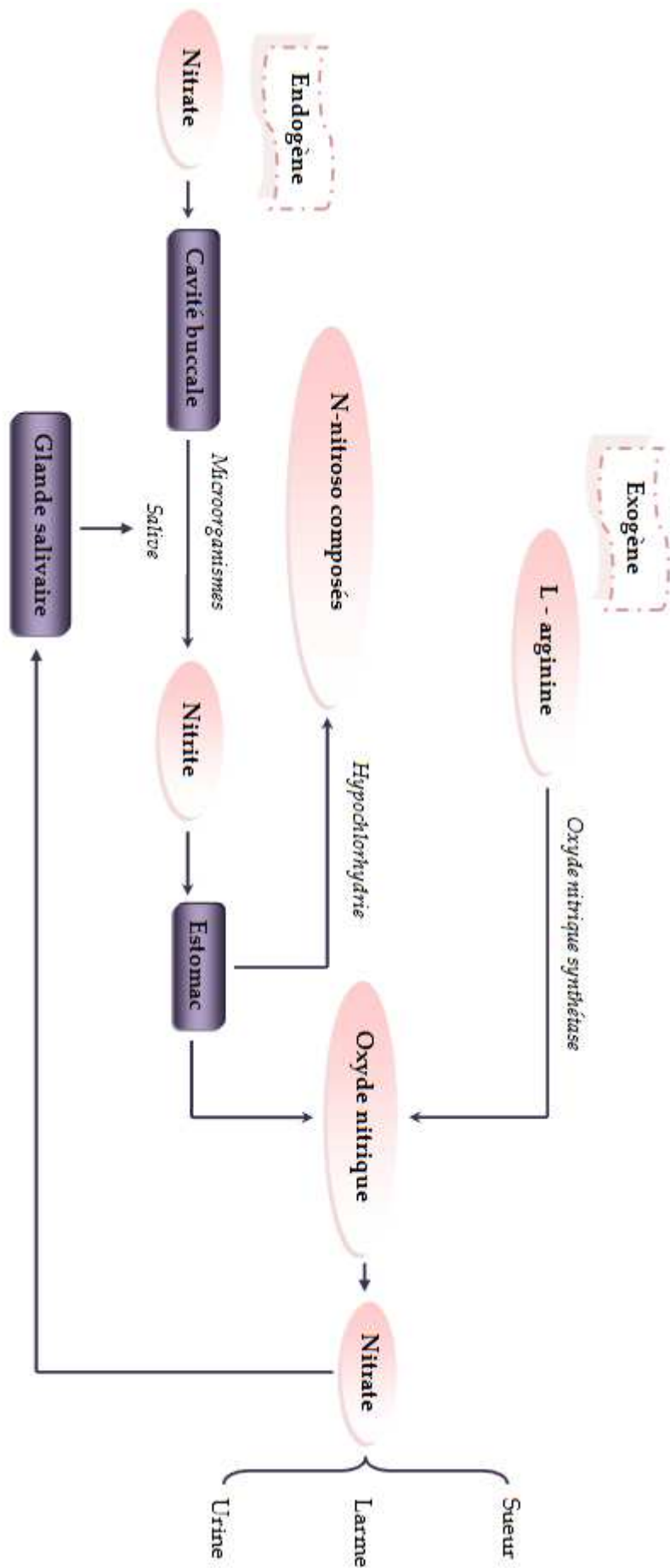


Figure 3 : Mécanismes de translocation et transformation de nitrate dans le corps humains (DU et al, 2007).

## 1.8. Exposition au nitrate

### 1.8.1. Effet du nitrate sur l'environnement

**1.8.1.1. Effet du nitrate sur l'atmosphère :** les divers processus de combustion liés à l'activité anthropique (en particulier l'utilisation de véhicules à moteur), enrichie l'atmosphère en oxydes d'azote. Comme c'est le cas pour les oxydes d'azotes issus de sources naturelles, ceux-ci sont transformés en nitrate d'ammonium et nitrate de calcium. Cette concentration atmosphérique en nitrates peut être particulièrement accrue au voisinage des grandes agglomérations où la circulation routière est importante. Lorsque ces substances sont émises dans l'atmosphère, elles sont susceptibles d'être transportées sur de grandes distances par les vents dominants avant de retomber sur terre sous forme de précipitations acides (pluie, neige, brouillard ou poussière). L'environnement ne parvient pas à neutraliser les substances acides, des dommages s'installent (Ramade, 2005).

**1.8.1.2. Effet du nitrate sur le sol :** l'effet principal des nitrates sur le sol, consiste à favoriser la croissance végétale. Cet impact, qui peut apparaître bénéfique dans un premier temps, s'avère désastreux pour certaines cultures (vigne, arbres fruitiers, betterave à sucre, tournesol, etc.), en favorisant des maladies fongiques et ou l'infestation par les insectes. En plus le nitrate d'ammonium n'est jamais enfoui au moment des semailles, comme les autres fertilisants potassiques ou phosphatés. Un apport d'engrais azoté au moment des semailles pollue le sol et ne fertilise pas (Testud, 2004).

**1.8.1.3. Effet du nitrate sur l'écosystème aquatique :** l'eau, compte tenu de ses propriétés physico-chimiques, est souvent utilisée comme un vecteur d'évacuation de déchets ; polluée, elle devient source de pollutions. Les activités d'élevage, l'épandage de fumiers et l'emploi immodéré des engrais azotés provoquent une pollution des nappes phréatiques par les nitrates, consécutive à des phénomènes de ruissellement en surface et de percolation en profondeur. Les eaux d'égout et les fleuves contaminés se jettent dans les mers, provoquent ou accélèrent un phénomène naturel qu'on appelle l'eutrophisation (Koller, 2009). Lorsque les concentrations en azote du milieu aquatique

sont élevées, la production d'algues microscopiques (phytoplancton) et de végétaux fixés (macrophytes) est exacerbée. La quantité de matière organique présente dans le milieu aquatique s'accroît démesurément (Camargo *et al*, 2005). À la mort de ces végétaux, la matière organique se décompose en consommant tout l'oxygène de la colonne d'eau, induisant ainsi l'anoxie du milieu aquatique, et la mort de la plupart des animaux qui y vivent entraînant la disparition de l'écosystème aquatique (Rouse *et al*, 1999). Ainsi, diverses études ont mis en évidence des corrélations entre les teneurs en nitrates dans l'eau ou les quantités d'engrais azotés épandus et le déclin des populations aquatiques (Camargo *et al*, 2005).

## 1.8.2. Effets du nitrate sur la santé humaine

**1.8.2.1. Formation de la méthémoglobine :** la forte consommation de nitrate et sa réduction ultérieure en nitrite mène à la formation de méthémoglobine (MetHb) (L'hirondel et L'hirondel, 2002), l'atome de fer ( $Fe^{2+}$ ) présent dans l'hème prend par oxydation sa forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ), ce dérivé d'hémoglobine est incapable de fixer l'oxygène, ce qui réduit son transport des poumons vers les tissus (Mansouri et Lurie, 1993). Cette maladie est dénommée méthémoglobinémie. Chez l'adulte, ce risque est très faible car une enzyme réduit la méthémoglobine en hémoglobine. En revanche, les nourrissons sont beaucoup plus sensibles à la formation de metHb pour diverses causes:

- ✓ l'hémoglobine fœtale s'oxyde plus aisément en méthémoglobine.
- ✓ l'enzyme méthémoglobine réductase n'est pas activée chez les nourrissons et ne devient fonctionnelle que vers trois à quatre mois.
- ✓ le pH dans l'estomac du nourrisson est plus élevé que celui d'un adulte car les sécrétions gastriques acides sont plus faibles durant les premiers mois de la vie. Ce pH élevé semble permettre un développement plus aisé des bactéries ayant une activité nitrate réductase.

Par conséquent, lorsqu'il y a ingestion d'une forte quantité de nitrate dans des conditions favorisant sa conversion en nitrites, la méthémoglobine s'accumule. L'enfant développe alors une coloration bleue de la peau qui débute par les lèvres, puis les bouts des doigts, et peut éventuellement s'étendre à l'ensemble du corps. Pour cette raison,

cette pathologie est plus fréquente chez le nourrisson, appelée aussi syndrome du bébé bleu ou maladie bleue du nourrisson (Knobeloch *et al*, 2000).

❖ **Réduction de la méthémoglobine :** il existe *in vivo* une production lente de méthémoglobine, à des taux constants, par passage d'un électron de l'hème sur l'oxygène lors de la libération de ce dernier. Après la perte de cet électron, l'oxygène ne peut se fixer sur la forme oxydée (ferrique) de l'hème, à moins d'une nouvelle captation d'un électron grâce à des mécanismes de réduction intracellulaires. Comme les capacités érythrocytaires de réduire l'hème oxydé dépassent très largement le taux d'oxydation spontanée de l'hème, moins de 1 % de l'hémoglobine totale normale est sous la forme ferrique de méthémoglobine (Wright *et al*, 1999).

Dans le globule rouge deux enzymes ou groupes d'enzymes catalysent la réduction de l'hémoglobine. On les distingue l'une de l'autre selon que le donneur d'électrons est le NADH.H<sup>+</sup>, provenant de la glycolyse, ou le NADPH.H<sup>+</sup>, issu de la voie des pentoses. Les mécanismes de réduction de la méthémoglobine qui utilise le NADH.H<sup>+</sup> comme donneur d'électrons est le plus important sur le plan physiologique. Il existe plusieurs dénominations pour l'enzyme à NADH.H<sup>+</sup> : diaphorase I, NADH déshydrogénase I, coenzyme facteur I, ferrihémoglobine réductase et cytochrome b<sub>5</sub> réductase, mais le terme de NADH-méthémoglobine réductase est le plus utilisé. La NADPH<sub>2</sub>-méthémoglobine réductase (diaphorase II) manque *in vivo* d'un accepteur intracellulaire d'électrons et, de ce fait, est physiologiquement inactive. Elle peut être activée par apport d'un accepteur exogène d'électrons comme le bleu de méthylène, ce dernier réduit rapidement la méthémoglobine par un mécanisme non enzymatique (Johnson, 2005). Un autre mécanisme de réduction de la méthémoglobine comporte le transfert direct d'électrons de l'acide ascorbique ou du glutathion vers l'hème, réduit les risques de développement de la maladie (figure 4) (Meister, 1994).

❖ **Aspect clinique :** les symptômes d'intensité variable sont souvent modérés. Des concentrations de 10 à 25 % de méthémoglobine entraînent une simple cyanose ; vers 35 à 40 % il peut exister une discrète dyspnée d'effort, des céphalées, une asthénie, une tachycardie et des bourdonnements d'oreille. Une léthargie puis un coma s'observent à

partir des concentrations de 60 %. La concentration létale pour les adultes est probablement supérieure à 70 % (Johnson, 2005). La méthémoglobinémie est donc en fait rarement responsable de décès. Au cours de la méthémoglobinémie, on peut retrouver des corps de Heinz intra-érythrocytaires, et observer un certain degré d'anémie hémolytique (Stellman, 2000).

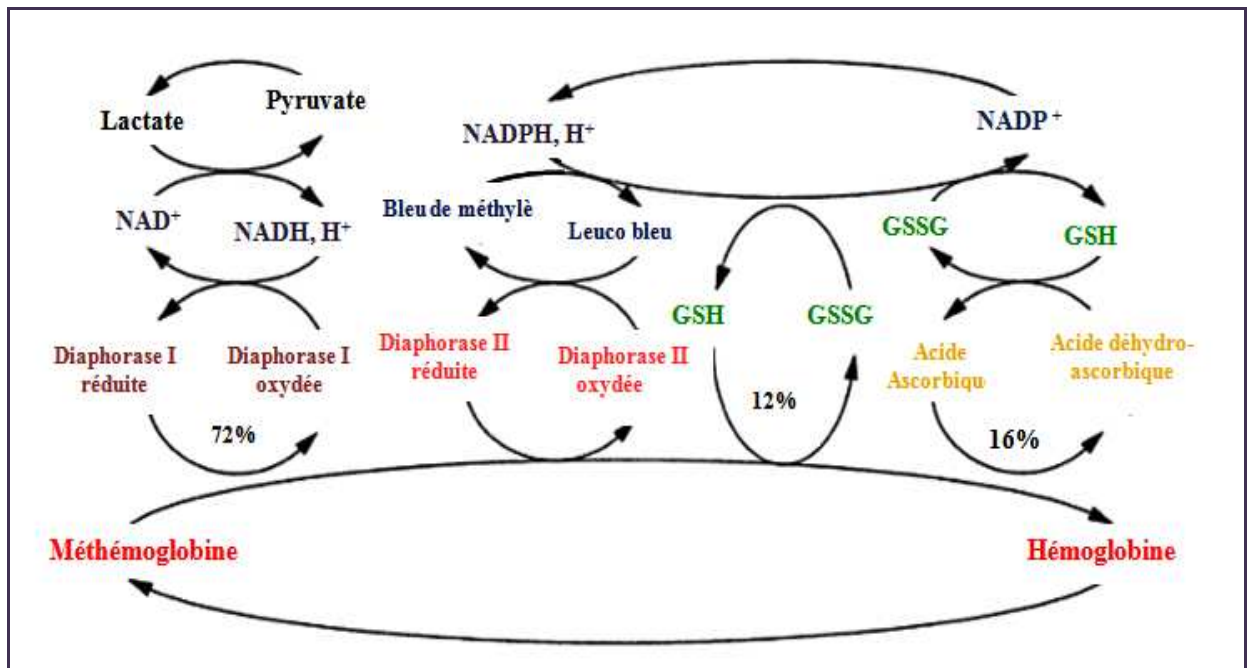


Figure 4 : Catabolisme de la méthémoglobine (Vaubourdolle, 2007)

**1.8.2.2. Effet cancérigène du nitrate :** les nitrates sont susceptibles de présenter un risque lié à leur transformation en nitrites et éventuellement en nitrosamines dans le tractus digestif. Les propriétés carcinogènes de ces substances ont été découvertes il y a un demi-siècle (Magee et Barnes, 1967). Certaines études épidémiologiques et toxicologiques suspectent l'implication des concentrations élevées dans l'eau et les aliments est le développement des cancers : gastro-intestinal (Barrett *et al*, 1998 ; De Roos *et al*, 2003), du cerveau (Ward *et al*, 2005), du pancréas (Coss *et al*, 2004), urinaire (Ward *et al*, 2003 ; Volkmer *et al*, 2005 ; Zeegers *et al*, 2006), et d'autres (Weyer *et al*, 2001). Démontrer avec certitude une telle relation est particulièrement difficile étant donné le temps de latence entre la cause et le dépistage de la pathologie qui peut dépasser 20 ans (Hill, 1991). En absence de certitudes absolues, ces résultats imposent de prendre les précautions nécessaires afin de préserver la santé humaine.

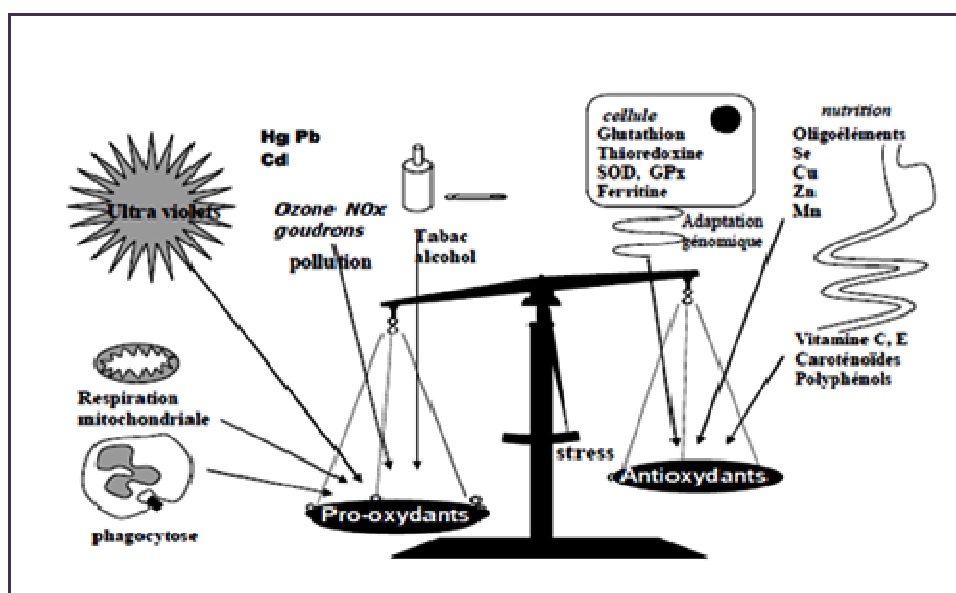
## *Deuxième chapitre : Stress oxydant*

- ❖ *Définition du stress oxydant*
- ❖ *Origine du stress oxydant*
- ❖ *Définition et origine des radicaux libres*
- ❖ *Potentialité toxique des espèces radicalaires*
- ❖ *Implication du stress oxydant dans les pathologies*
- ❖ *Les systèmes de défenses antioxydants*

## 2. Le stress oxydant

### 2.1. Définition du stress oxydant

Dans les circonstances normales, les cellules des êtres aérobies produisent en permanence et en faibles quantités des espèces réactives d'oxygène (ERO) à l'issue de nombreux processus cellulaires. Le contrôle rigoureux des systèmes de défense préserve les cellules de leurs effets néfastes, dans ces circonstances on dit que la balance (antioxydant/pro-oxydant) est en équilibre. Quand cet équilibre est rompu par déficit en antioxydant ou une surproduction incontrôlée d'espèces radicalaires et leurs dérivées secondaires il survient un stress oxydant (Favier, 2003 ; Helliwell et Gutteridge, 2007) (figure 5).



**Figure 5:** La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006)

### 2.2. Origine du stress oxydant

Les causes essentielles de stress oxydant sont d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques pro-oxydants, etc.), ou d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira à la formation des ERO qui mèneront aux mécanismes pathogènes (Bartosz, 2003 ; Favier, 2003).

### 2.3. Définition des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique qui a la particularité de porter un électron célibataire (ou non apparié) sur sa couche externe, cet état lui confère une instabilité énergétique et cinétique qui le rend généralement capable de réagir avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les réactions de transfert d'électrons qu'il produit conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène se propage par des réactions en chaîne (Asmus *et al*, 2000). On trouve plusieurs types d'espèces réactives d'oxygène et d'azote tel que :

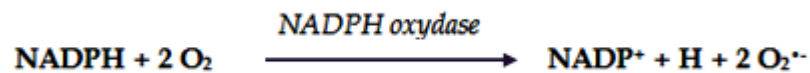
#### 2.3.1. Le radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

Il existe trois voies de génération endogène des anions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ), à savoir : la chaîne de transfert des électrons située au niveau des mitochondries; la flambée respiratoire des cellules phagocytaires; ainsi que l'activité des enzymes de type oxydase.

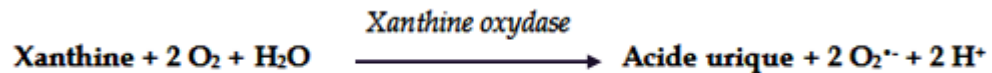
❖ **La respiration mitochondriale** : la chaîne respiratoire mitochondriale constitue la source principale produisant environ 80 % d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Turrens, 2003). Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final « l'oxygène », qui est réduit complètement en  $H_2O$ . L'énergie ainsi libérée sous forme d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne est alors utilisée par l'ATP synthétase pour donner l'ATP. Dans ces conditions, le fonctionnement de l'ATP synthétase est couplé à celui de la chaîne respiratoire. Lorsque la respiration devient plus intense (par exemple : effort physique), une proportion significative de l'oxygène (2 à 6 %) échappe à la réduction complète en  $H_2O$  et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I (NADH/ubiquinone réductase) et III (ubiquinol/Cytochrome c réductase) de la chaîne respiratoire pour donner l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), chef de file des ERO (Carrière *et al*, 2006) (figure 6).



❖ **La poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (*respiratory burst*)** : est par ailleurs une source importante de l'anion superoxyde qui est produit au niveau de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique formé de plusieurs sous unités capables d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane des cellules phagocytaires activées. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la digestion du matériel phagocyté (Babior *et al*, 2002 ; Favier, 2003) (figure 7).



❖ **Réaction d'oxydation** : le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante (Terada *et al*, 1991).



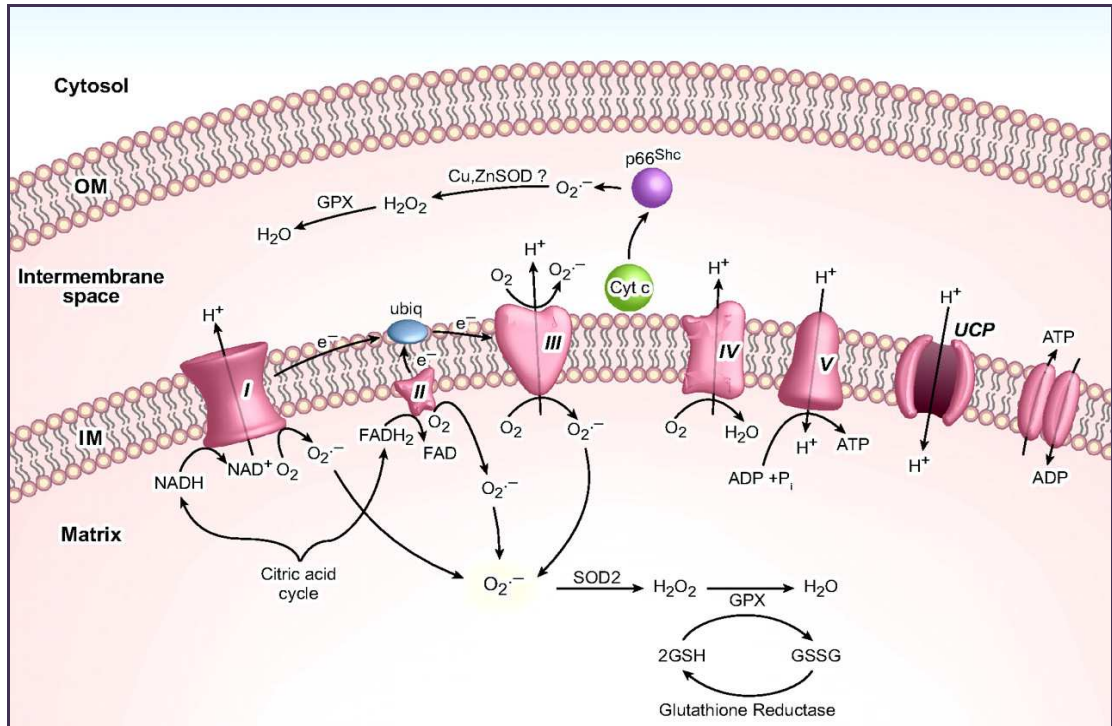


Figure 6 : Phosphorylation oxydative, production de superoxyde, et les voies d'élimination dans les mitochondries (Nageswara *et al*, 2007).

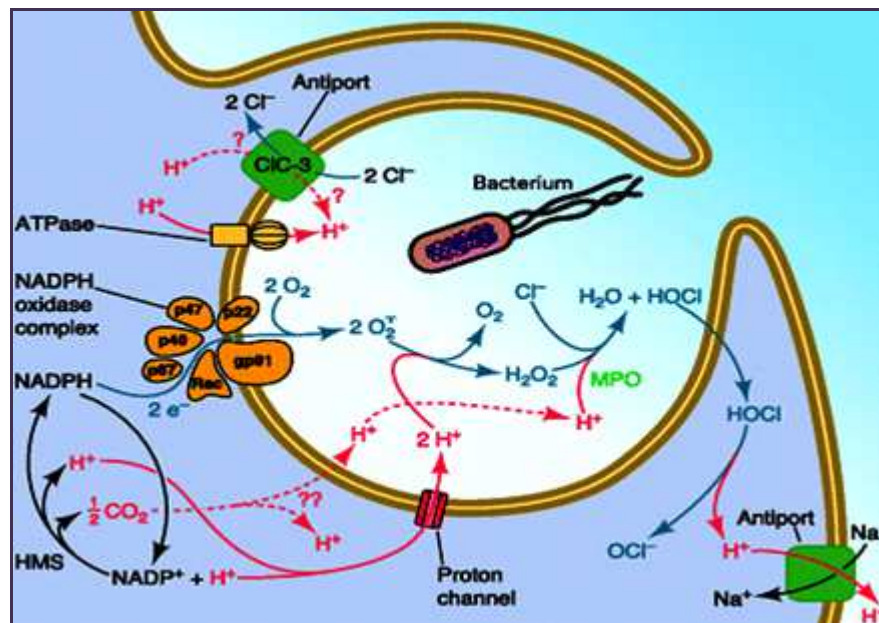
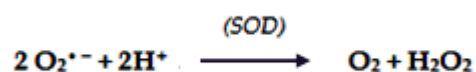


Figure 7 : poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (DeCoursey, 2010).

### 2.3.2. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique, l'absence de charge à sa surface rend cette ERO peu réactif en milieu aqueux mais très lipophile capable de traverser les membranes biologiques et se retrouver distant de son lieu de synthèse. Sa toxicité se traduit par le fait qu'il participe à la formation du radical hydroxyle (OH•) (Cash *et al*, 2007). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se forme par la dismutation du radical superoxyde elle est soit spontanée ou enzymatique catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), ou les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes (kohen et nyska, 2002).

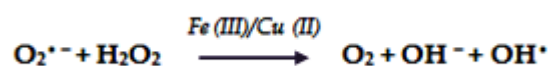


### 2.3.3. Radical hydroxyle (OH•)

Le radical hydroxyle (OH•) apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge, 1993). Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical, on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leurs forme réduite par une réaction appelée réaction de Fenton (Favier, 2003).



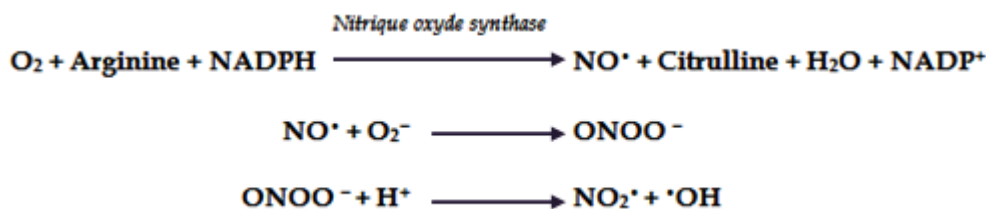
L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du OH•, ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).



### 2.3.4. L'anion monoxyde d'azote (NO•)

Les systèmes enzymatiques nitrique oxyde synthase (NOS) produisent à partir de l'acide aminé L-arginine, le monoxyde d'azote à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Rappelons que la production

concomitante dans un même lieu de  $\text{NO}^\bullet$  et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxynitrite ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le  $\text{NO}_2$  et le  $\text{OH}^\bullet$  (Sorg, 2004).



D'autres sources ou modes de génération exogène des ERO existent de part les interactions avec le milieu environnant ; par exemple :

- ✓ L'ingestion de toxique (métaux lourds : chrome, cuivre, vanadium...) (Flora *et al*, 2008).
- ✓ L'inhalation de certaines particules comme l'amiante ou la silice qui sont aussi génératrices de ERO, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer (Favier, 2003).
- ✓ La fumée de cigarette contient plusieurs millions d'ERO altérant directement le premier organe à leur contact : le poumon (Zang *et al*, 1995).
- ✓ L'usage mal contrôlé de certains médicaments, comme le paracétamol (Abraham, 2005).

## 2.4. Potentialité toxique des espèces radicalaires

Le rôle délétère des radicaux libres est de plus en plus connu. Il a été suggéré pour la première fois par Harman (1956) qui proposait que les ERO formées peuvent potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Cependant, les cibles préférentielles des ERO sont les lipides, suivis par les protéines et les bases constitutives du matériel génétique.

### 2.4.1. La peroxydation lipidique

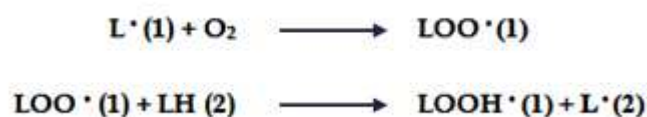
L'agression par les ERO déclenche une réaction en chaîne « la peroxydation lipidique », elle se déroule en trois phases (Oostenbrug *et al*, 1997 ; Lacolley, 2007) (figure 8).

❖ **L'initiation** : l'acide gras polyinsaturé est attaqué par un radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), ce dernier est capable d'arracher l'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles

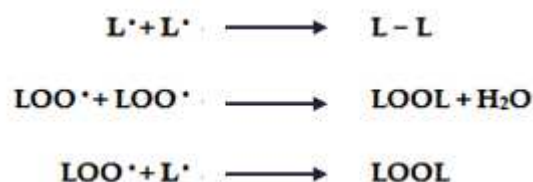
liaisons, position particulièrement fragile pour donner un radical lipidique ( $R\bullet$ ). Par réarrangement des doubles liaisons, il se forme un diène conjugué. Cette molécule réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde ( $ROO\bullet$ ).



❖ **La propagation** : le radical peroxyde ( $ROO\bullet$ ), en arrachant un hydrogène à une molécule d'acide polyinsaturée adjacente, devient un hydroperoxyde ( $ROOH$ ), tandis que le deuxième acide gras subit la même suite de modifications en donnant un autre radical lipidique ( $R\bullet$ ), ce dernier peut être réactivé par réaction de Fenton qui le convertit en radical alkoxy ( $RO\bullet$ ) très réactif. Les hydroperoxydes ( $ROOH$ ) peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase (GPx) ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents fragments dont le malonalaldéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (kohen et nyska, 2002).



❖ **La terminaison** : cette phase consiste à former des composés stables le plus souvent à l'issue de la réaction d'un radical avec des molécules antioxydantes dite 'briseur de chaîne' comme la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes.



La peroxydation lipidique est considérée comme une des conséquences les plus vulnérables des attaques radicalaires. Elle est responsable des altérations cellulaires et diminution de la fluidité membranaire Elle peut toucher aussi les lipoprotéines circulantes LDL aboutissant à leurs oxydation qui, une fois captées par des

macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome favorisant le développement des maladies cardiovasculaires (Esterbauer *et al*, 1992 ; Davies, 2000 ; Favier, 2003).

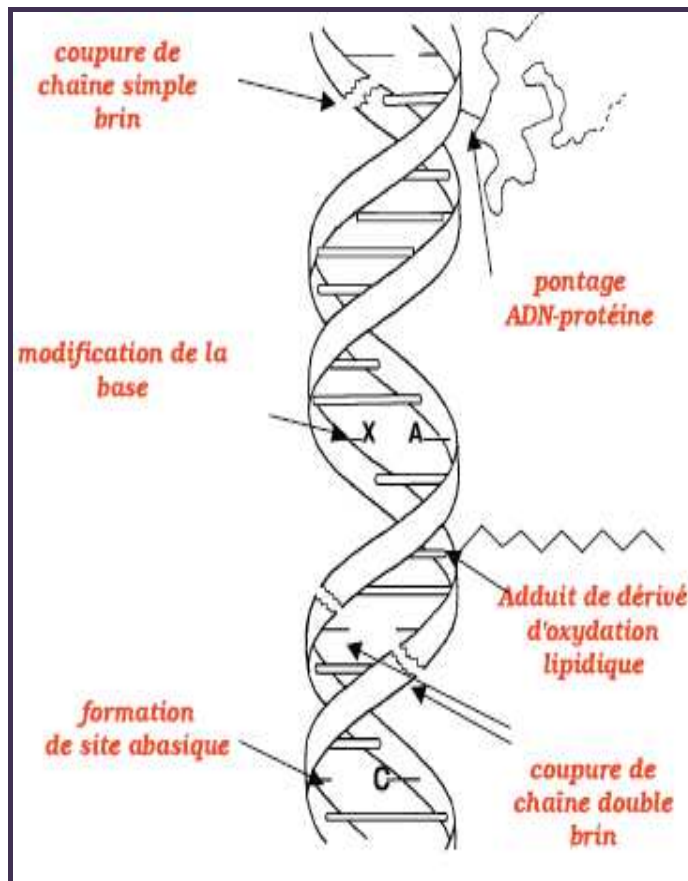
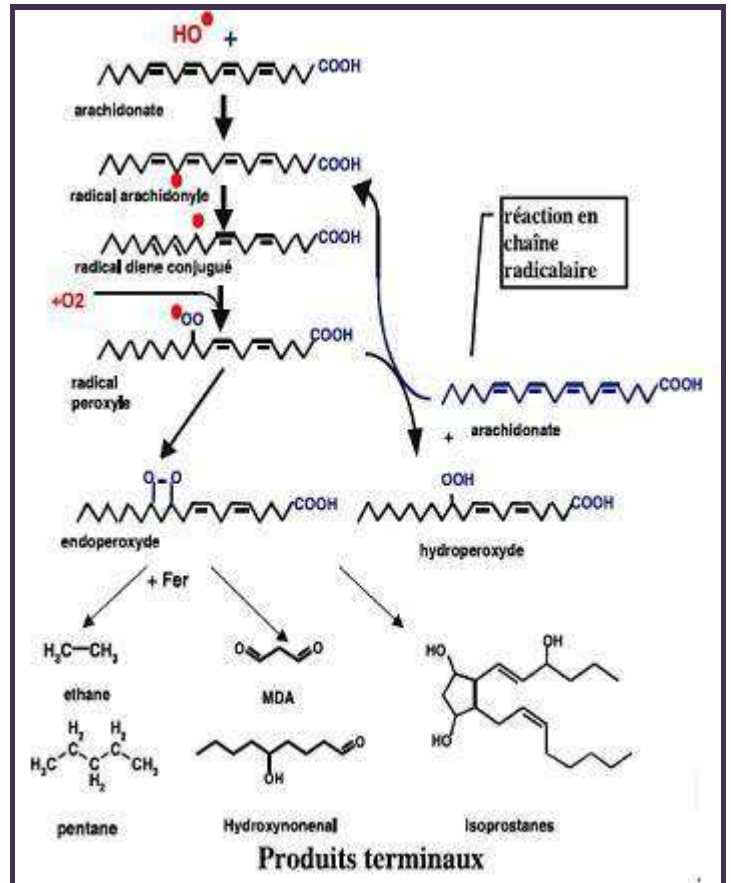
#### 2.4.2. Dommages oxydatifs de l'ADN

L'ADN est très sensible aux attaques par les radicaux de l'oxygène. Cinq classes principales de dommages oxydatifs incités par OH• peuvent être générées (Hartmann et Niess, 2000 ; Cadet *et al*, 2002) (figure 9).

- ✓ L'attaque directe des bases puriques et pyrimidiques engendre un grand nombre de bases modifiées, particulièrement la guanine qui est transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG).
- ✓ La formation d'un site abasique non fonctionnel suite à l'attaque de la liaison entre la base et le désoxyribose.
- ✓ L'oxydation du désoxyribose provoque une coupure de chaîne simple brin.
- ✓ L'agression radicalaire des protéines (histones), qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines.
- ✓ La création d'adduits avec des dérivés de la peroxydation lipidique, tel que le malonalaldéhyde-guanine.

Ces altérations du matériel génétique représentent la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Favier, 2003 ; Valko *et al*, 2007).

**Figure 8 :** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)



**Figure 9 :** Lésions de l'ADN l'attaque radicalaire (Favier, 2003)

### 2.4.3. Oxydation des protéines

Les protéines peuvent subir une oxydation de leurs acides aminés, soit au niveau de la chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (Berlette et Stadtman, 1997). Les acides aminés les plus sensibles aux attaques radicalaires sont ceux renfermant un atome de soufre et les acides aminés aromatiques (Dean *et al*, 1997). L'oxydation de ces acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines et peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements. Ils seront particulièrement susceptibles à la protéolyse afin d'éviter leur accumulation dans le noyau, le cytoplasme ou le réticulum (Jung *et al*, 2007). Les protéines dénaturées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent incapables de se fixer correctement sur un récepteur ou fixer spécifiquement un ligand, altérant ainsi la signalisation cellulaire. Elles deviennent hydrophobes, et forment des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus âgés (Favier, 2003).

### 2.4.4. Oxydation des glucides

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques et en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes,  $H_2O_2$  et  $OH^\bullet$ , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un produit de glycation avancée ou AGE (Advanced Glycation End products). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

## 2.5. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Plusieurs recherches ont confirmé l'implication du stress oxydant dans une multitude de maladies, comme le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse pulmonaire aigu, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Kuloglu *et al*, 2002 ; Judge *et al*, 2005; Haliwell, 2006 ; Pak *et al*, 2006; Valko *et al*, 2007; Ng *et al*, 2008).

## 2.6. Les systèmes de défenses antioxydants

Les cellules sont équipées de divers systèmes antioxydants distribués dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Powers et Sen, 2000). Dans leur définition du terme antioxydant, Halliwell et Gutteridge (1989) désignent au sens large, l'ensemble des molécules dont la teneur diminue lors d'un stress oxydant, en donnant des dérivés plus stables et bloquant la phase de propagation. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances qui agissent en synergie soit en inhibant la formation des ERO (la séquestration des métaux de transition empêche la réaction de Fenton et la production de OH•) ou en les métabolisant grâce à des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) ou même en se sacrifiant pour piéger l'électron célibataire du radical libre et le neutraliser (figure 10).

### 2.6.1. Les systèmes enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. On peut citer : la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites, utilisent un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

❖ **La Superoxyde dismutase (SOD)** : les superoxydes dismutases sont capables d'accélérer la dismutation de deux anions superoxydes en une molécule d'oxygène et

une molécule de peroxyde d'hydrogène (Zelko *et al*, 2002). La superoxyde dismutase existe sous plusieurs isoformes, formé d'un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc (cCu-ZnSOD) protégeant le cytosol, la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (Zelko *et al*, 2002 ; Favier, 2006).

❖ **La Catalase (CAT) :** la catalase est une enzyme commune trouvée dans presque tous les organismes aérobies où elle fonctionne pour accélérer la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. Une molécule de catalase peut convertir des millions des molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire par seconde. Chez les mammifères la structure de la catalase est très complexe. Formée de quatre sous-unités identiques dont chacune a un poids d'environ 60 KDa, elle est prépondérante dans le foie, les reins, les érythrocytes (Deisseroth et Dounce, 1970).

❖ **La Glutathion peroxydase (GSH-Px ou GPx) :** le rôle principal de cette enzyme est de protéger l'organisme des dégâts induits par le peroxyde d'hydrogène, mais aussi des peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium, son déficit entraîne une diminution de l'activité enzymatique. Il existe plusieurs isoformes codés par des gènes différents, qui varient dans l'emplacement cellulaire et la spécificité de substrat (Favier, 2003).

- ✓ GPx-1 est une protéine tétramérique avec quatre sous-unités identiques, dont chacune contient un résidu seleno-cystéine avec un poids moléculaire total de 22-23 kDa. Cette forme de GPx est la plus abondante, trouvée dans le cytoplasme (Epp *et al*, 1983).
- ✓ GPx-2 est une glutathion peroxydase gastro-intestinal. Les fonctions de GPX-2 sont très spécialisées, elle assure la protection contre les hydro-peroxydes dans la

nourriture et participe particulièrement dans la protection contre tous changements promouvant le cancer gastro-intestinal (Bermano *et al*, 1995).

- ✓ GPx-3 est une glycoprotéine purifiée du plasma humain, agit contre la peroxydation des phospholipides ce qui lui donne un rôle direct dans la protection des membranes cellulaires. De plus, dans la thyroïde GPX-3 peut contrôler les niveaux de peroxyde d'hydrogène nécessaire à la synthèse d'hormone thyroïdienne (Howie *et al*, 1995).
- ✓ GPx-4 est une protéine de poids moléculaire environ 20-22 KDa. Cette protéine est caractérisée par une structure monomérique, associée des fois aux membranes cellulaires et agit en synergie avec la vitamine E pour prévenir la peroxydation lipidique (Maiorino *et al*, 1989).

❖ **La Glutathion réductase (GSH-R) :** quant à elle, la GR a pour rôle de régénérer le glutathion réduit (GSH) à partir du glutathion oxydé (GSSG) tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur. Cette activité enzymatique dépend des apports alimentaires de riboflavine (Sorg, 2004).

### 2.6.2. Système non enzymatique

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes et exogènes. Parmi les molécules endogènes on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la ferritine, la transferrine, la céruloplasmine et l'albumine, la lactoferrine et bien d'autres, permettent de chélater les métaux de transition ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^{+}$ ) impliqués dans la formation de radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Haber-Weis et Fenton. De nombreuses substances exogènes comme les oligoéléments (Se, Cu, Co, Mn, Fe), les vitamines (E «tocophérol», C «ascorbate», Q «ubiquinone», ou les caroténoïdes (vitamine A et  $\beta$ -carotène) apportés notamment par une alimentation riche en fruits et légumes, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Pincemail *et al*, 2002 ; Koechlin-ramonatxo, 2006). La vitamine piègeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (scavenger). De très nombreux composés alimentaires peuvent

aussi avoir ce comportement : les polyphénols, les alcaloïdes, les phytates, les huiles essentielles et les flavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001) (tableau 3).

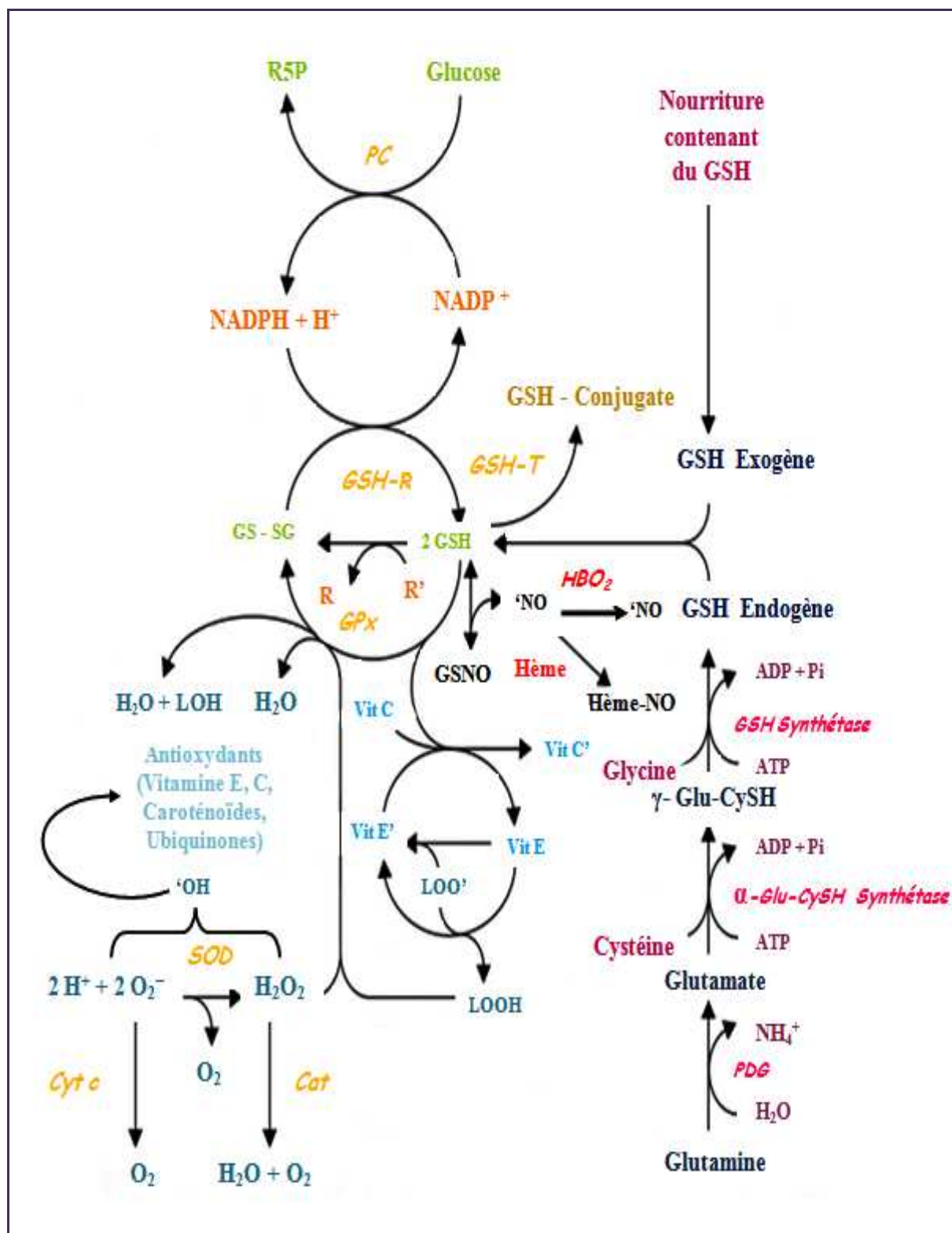
**Tableau 3** : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin-ramonatxo, 2006).

Nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
$\beta$ -carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins

❖ **Vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol)** : parmi les antioxydants naturels figurent les tocophérols dont on connaît 4 isomères :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . On les dénomme globalement vitamine E. L' $\alpha$ -tocophérol peut s'insérer au sein de la membrane biologique où elle agit en empêchant la peroxydation lipidique. Suite à leur interaction avec un radical lipidique ( $R\cdot$ ), l' $\alpha$ -tocophérol est oxydé en devenant un radical tocophéryle (Vit E $\cdot$ ), puis Il est régénéré par l'acide ascorbique (Vitamine C). Á son tour la vitamine C prend une forme radicalaire (Vit C $\cdot$ ) qui sera ultérieurement régénérée par l'action du glutathion réduit (GSH) en se transformant en un radical thylil (GS $\cdot$ ) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG) (Csala *et al*, 2001).

❖ **Vitamine C (Acide ascorbique)** : la vitamine C est un composé réducteur hydrosoluble, ces propriétés antioxydantes lui permettent d'une part l'interception les ROS et la diminution significative de leurs effets négatifs au niveau de la membrane cellulaire et d'autre part la régénération de l' $\alpha$ -tocophérol (Li *et al*, 2001).

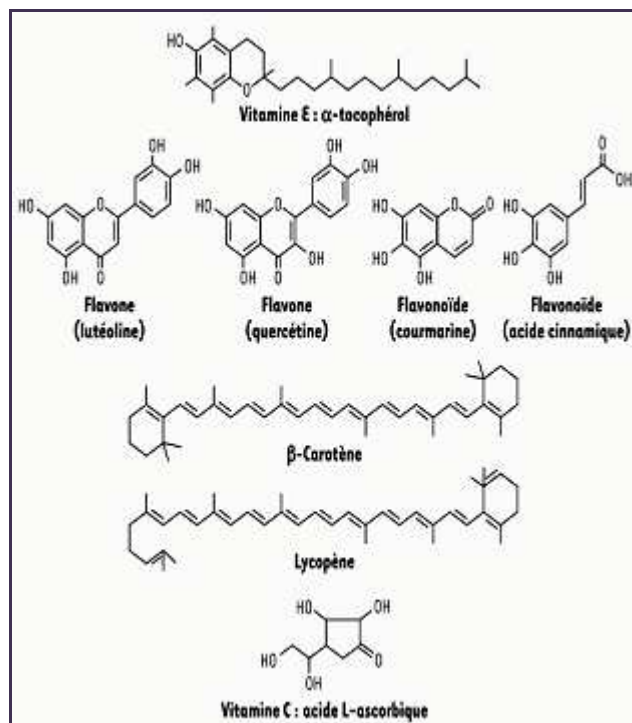
❖ **Le Glutathion (GSH) «  $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine »** : le glutathion ou thiol non protéique, est le plus abondant tripeptide dans le corps humain. La majeure partie du glutathion se trouve à l'intérieur des érythrocytes (~2 mmol/l), alors que sa concentration plasmatique est extrêmement faible (~10  $\mu$ mol/l). La synthèse de glutathion commence avec la formation de  $\gamma$ -glutamyl-cystéine, une réaction catalysée par  $\gamma$ -glutamyl cystéine synthétase et l'addition subséquente de la portion de la glycine par la glutathion synthétase. Bien que l'altération dans l'une de ces étapes peut évidemment modifier la capacité cellulaire à maintenir son pool de glutathion (Darmaun *et al*, 2005). Le glutathion fournit de nombreux rôles physiologiques importants : Il joue un rôle essentiel dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (Yu, 1994) ou le monoxyde d'azote (Favier, 2003), un processus durant lequel le glutathion passe d'une forme réduite (GSH) à une forme oxydée (GSSG), dans une réaction catalysée par la glutathion peroxydase en présence de NADPH comme cofacteur (Hayes et Mclellan, 1999). Dans les érythrocytes, le glutathion est responsable d'entretenir le fer sous sa forme réduite, une des conditions préalables pour la fonction de l'hémoglobine (Darmaun *et al*, 2005).



**Figure 10 :** Élimination des radicaux libres oxygénés et azotés et autres espèces réactives dans les cellules des mammifères (Fang *et al*, 2002).

❖ **Les oligoéléments** : le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite ( $Fe^{2+}$ ), peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton, d'Herber-Weiss) (Pincemail *et al*, 2007).

❖ **Polyphénols** : les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes (figure 11). Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre *et al*, 2005).



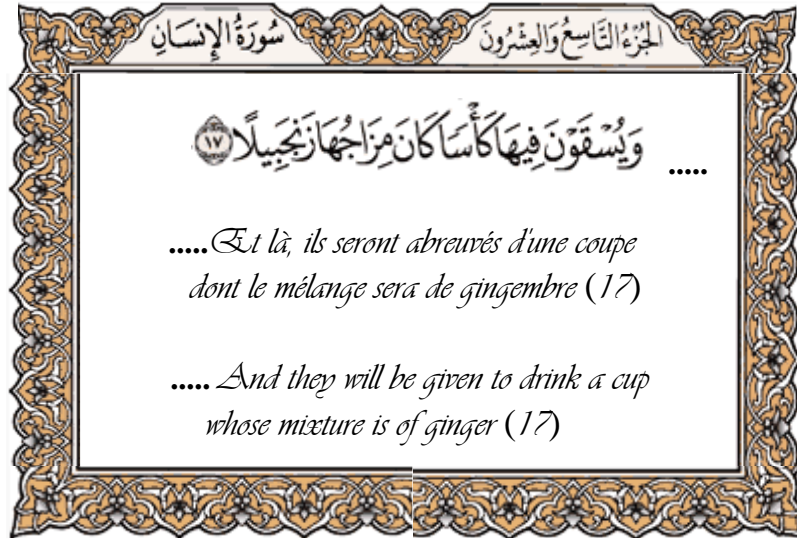
**Figure 11** : Principaux composés naturels possédant des propriétés antioxydantes

(Marc *et al*, 2004)

### *Troisième chapitre : Le gingembre (Zingiber officinale)*

- ❖ *Historique sur le gingembre*
- ❖ *Description botanique du gingembre*
- ❖ *Distribution géographique et conditionnement*
- ❖ *Production mondiale du gingembre*
- ❖ *Chimie de gingembre*
- ❖ *Propriétés pharmacologiques du gingembre*
- ❖ *Effets toxicologiques du gingembre*

قال الله تعالى :



صدق الله العظيم

### 3. Le gingembre

#### 3.1. Historique du gingembre

Depuis plus de trois milles ans des textes en sanskrit et en chinois mentionnent l'utilisation du gingembre, il fut l'une des premières épices orientales commercialisées dans le bassin méditerranéen, probablement grâce aux phéniciens (avant le IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C.). Son origine, comme celle de la cannelle, était jalousement gardée par les marchands. Certains la situent aux Indes, car les différentes formes préparées y ont toujours présenté des noms différents; d'autres la font naître en Chine puisqu'elle est mentionnée par *Confucius* dans ses "Analect".

Pendant longtemps les gens croyaient que le gingembre était la racine du poivre, c'est *Pline l'ancien* (23-79 après J.C.), le célèbre naturaliste romain qui mit fin à cette confusion. Les Grecs connurent le gingembre par l'intermédiaire probable des Perses et Dioscoride, physicien et médecin réputé du premier siècle, le cite dans son traité "De Materia Medica". Ce sont d'ailleurs les Grecs qui changeront le nom transcrit de la plante, "Singabera", en "Zingiberi" dont les Latins feront plus tard "Zingiber", forme que l'on retrouve dans les écrits gastronomiques d'*Apicius Coelius* à l'époque d'Auguste et de Tibère.

Au cours de ses voyages en Orient vers 1285, Marco Polo fut le premier Européen à voir la plante et sa culture dans diverses provinces de Chine, au Bengale et au Malabar mais ne la décrivit pas. Les premières descriptions du végétal ont été faites en 1292 par Jean De Monte-Corvino et Nicolas Conti. Les Arabes vont remplir un rôle essentiel dans la dispersion de cette plante (citée dans le *Coran* 76 : 15-17), non seulement en fournissant des rhizomes aux pays voisins de la Méditerranée dès le 7<sup>ème</sup> siècle, mais aussi, six siècles plus tard, en introduisant celle-ci en Afrique de l'Est d'où les Portugais la transplanteront progressivement vers la côte occidentale et vers l'île de Sao Thomé, laquelle deviendra leur centre principal d'approvisionnement. Très tôt après la découverte du Nouveau Monde, le gingembre y sera introduit par Francesco de Mendoca, fils du Vice-Roi du Mexique et, de là, il se répandra dans toutes les Antilles où sa culture connaîtra un prodigieux essor, il coûtait très cher, servait de monnaie d'échange et donnait lieu à un impôt. Le gingembre tombe dans l'oubli au XVIII<sup>ème</sup> siècle, avant de redevenir très utilisé de nos jours (Langner *et al*, 1998 ; Bode et Dong, 2011).

### 3.2. Description botanique du gingembre

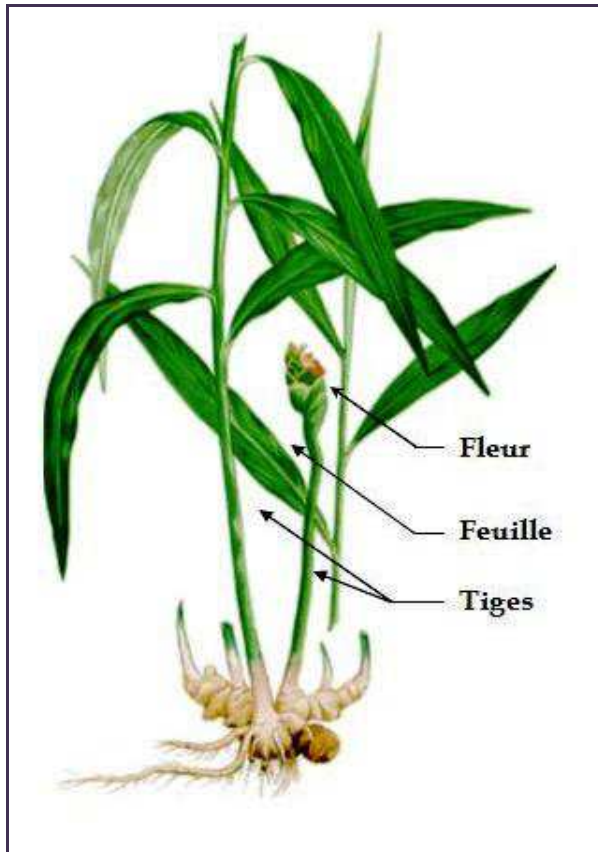
Le *Zingiber Offinale* Roscoe est une plante herbacée vivace, dont le nombre chromosomique est  $2n = 22$ . Elle possède une tige souterraine appelée rhizome caractérisée par une odeur forte aromatique et une saveur âcre, chaude et poivrée. Désigné sous le nom de patte ou de main, ce rhizome horizontal et charnu développe de nombreux doigts lui donnant un aspect palmé, de 3 à 10 cm de long, de 1,5 à 2 cm de large et de 1 à 1,5 cm d'épaisseur. Ils sont recouverts d'une écorce écailleuse de couleur beige pâle, ridée longitudinalement, possédant des anneaux bien visibles, son contact est rugueux.

De ces rhizomes, partent des racines et deux sortes de rameaux aériens lui donnant un port de roseau se sont les tiges. Elles sont verticales les plus grandes stériles (1 à 1,50 m) munies de feuilles lancéolées, glabres, rubanées et alternes, les plus petites (15 à 20 cm) sont fertiles et se terminent par une inflorescence aux nombreuses fleurs, dont la corolle jaune verdâtre entoure un label de même couleur légèrement tacheté de pourpre.

Les fleurs, sont rarement fertiles; si les fruits arrivent à maturité, ils sont constitués d'une petite capsule à trois loges contenant plusieurs graines anguleuses de couleur noire (Ross, 2010) (figure 12). Le tableau 4 indique la classification botanique du gingembre :

**Tableau 4 :** La classification botanique de *Zingiber officinale* (Faivre *et al*, 2006).

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Trachéobionta
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	Magnoliophyta (ou Angiospermes)
<b>Classe</b>	Liliopsida (ou Monocotylédones)
<b>Sous-classe</b>	Zingiberidae
<b>Ordre</b>	Scitaminales ou zingibérales
<b>Famille</b>	Zingiberaceae
<b>Genre</b>	<i>Zingiber</i>
<b>Espèce</b>	<i>officinale</i>



**Figure 12 :** La plante et le rhizome de *Zingiber officinale* (Le gingembre) (Bruneton, 2009)

### **3.3. Distribution géographique et conditionnement**

#### **3.3.1. Exigence climatique**

Le gingembre est originaire d'Asie, il est largement cultivé dans les régions tropicales et pays subtropicaux jusqu'à des altitudes de 1.500 m, on peut citer par exemple : Inde, Chine, Sri Lanka, Mexique, Jamaïque, Australie, Nigéria, Congo, Sierra-Léone et Japon. Il exige un grand ensoleillement et une pluviosité importante aussi bien en volume qu'en régularité; la plante prospère dans les régions où la pluviométrie moyenne annuelle est supérieure à 2000 mm. Dans les régions moins arrosées, il est nécessaire de recourir à l'irrigation. Le gingembre s'accommode d'une saison sèche, qui incite le repos végétatif (Boullard, 2001).

#### **3.3.2. Exigence pédologique**

Le gingembre donne son meilleur rendement sur un sol riche bien structuré, drainé et sain. Il s'accommode de nombreux sols : sols de jardin humifère et assez léger, sols d'origine volcanique, sols alluvionnaires, sols sablo-limoneux, sols argilo-siliceux. Mais il est déconseillé de le cultiver sur un sol facilement inondable ou trop humide car le gingembre craint l'humidité en excès, les sols caillouteux ou argileux (argiles très compactes) sont aussi à proscrire. Il est déconseillé de le cultiver sur la même parcelle tous les ans. En effet, c'est une plante qui épuise le sol, il est nécessaire de l'alterner avec d'autres cultures. Et afin d'obtenir une croissance et une production satisfaisante, il est nécessaire de pratiquer le fumage et le paillage (Nair Prabhakaran, 2013).

### **3.4. Production mondiale du gingembre**

La production mondiale de gingembre est très difficile à définir, car les statistiques de production sont mal connues dans certains pays gros producteurs comme la Chine (tableau 5).

**Tableau 5 :** Production et zone mondiale de gingembre (Janick, 2012).

Pays	2002		2008	
	Zone (ha)	Production (t)	Zone (ha)	Production (t)
<b>Bangladesh</b>	7,689	43,000	9,421	77,046
<b>Chine</b>	23,002	253,263	28,198	328,810
<b>Inde</b>	90,500	317,900	105,900	370,300
<b>Indonésie</b>	17,000	151,000	42,000	192,341
<b>Jamaïque</b>	129	295	106	298
<b>Népal</b>	9,189	87,009	13,332	176,602
<b>Nigeria</b>	193,000	106,000	196,000	140,000
<b>Philippines</b>	3,642	23,022	3,926	27,538
<b>Sri Lanka</b>	1,290	5,080	2,080	10,050
<b>Thaïlande</b>	13,500	33,000	14,000	34,000

Comme on peut le constater, l'Inde est le plus grand producteur de gingembre au monde. Il faut souligner que la qualité du produit n'est pas égale dans toutes les régions; le meilleur gingembre est celui de la Jamaïque car il possède un arôme particulier et ses rhizomes longs et minces correspondent à la demande du marché. Le gingembre du Nigéria n'est pas de qualité supérieure quoique de saveur très forte et de teneur en huiles essentielles élevée. Les principaux pays importateurs sont la Communauté Européenne, les États-Unis et l'Arabie Saoudite. D'autres pays achètent le gingembre pour le revendre après transformation, c'est le cas de Singapour et de Hong Kong (Nyabyenda, 2006).

### 3.5. Chimie de gingembre

Le rhizome de gingembre est très riche en amidon, contient aussi des protéines, lipides, hydrates de carbone, minéraux, vitamines et des enzymes protéolytiques appelés zingibaine (Faivre *et al*, 2006). Le tableau suivant donne une indication sur la composition chimique pour 100 g de rhizome de gingembre.

**Tableau 6 :** Composition moyenne pour 100 g de gingembre (Gigon, 2012).

Racine de gingembre (valeur nutritive pour 100 g)					
Energie ~ 20 Kcal					
<b>Hydrate de carbone</b>	17,77	g	<b>Vit. B9 (Ac. Folique)</b>	11	µg
<b>Protéines</b>	1,82	g	<b>Vit. C</b>	05	mg
<b>Lipides</b>	0,75	g	<b>Phosphore</b>	34	mg
<b>Vit. B1 (thiamine)</b>	0,025	mg	<b>Calcium</b>	16	mg
<b>Vit. B2 (riboflavine)</b>	0,034	mg	<b>Magnésium</b>	43	mg
<b>Vit. B3 (niacine)</b>	0,075	mg	<b>Potassium</b>	415	mg
<b>Vit. B5 (Ac. pantothénique)</b>	0,203	mg	<b>Fer</b>	0,6	mg
<b>Vit. B6 (Pyridoxine)</b>	0,16	mg	<b>Zinc</b>	0,34	mg

La perception gustative et sensorielle de gingembre provient de deux groupes distincts de produits chimiques (Jolad *et al*, 2004 ; Singh *et al*, 2008) :

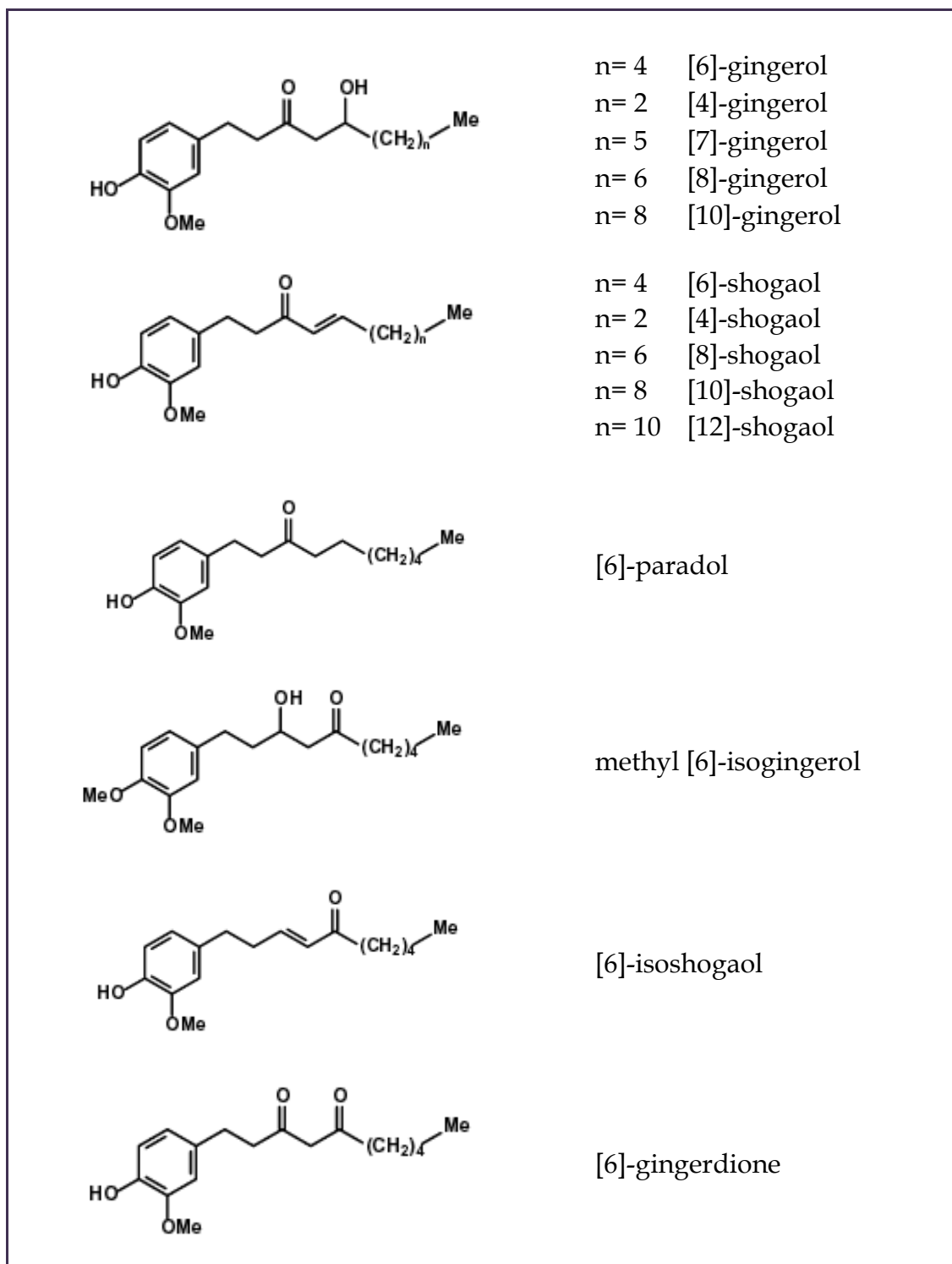
❖ **Les huiles volatiles :** l'odeur caractéristique du gingembre est due à la présence d'huile essentielle, c'est un liquide jaune verdâtre composé principalement de zingébérène, curcumène et β-sesquiphellandrène. Avec faible pourcentage des hydrocarbures monoterpénoïdes sont présents comme le camphène, le limonène, le néral, et le gèranial étant les plus abondants.

❖ **Composés piquants non volatiles :** la saveur brulante de l'épice est attribuée à l'oléorésine de gingembre. C'est un liquide sirupeux jaunâtre à légère amertume, contient des constituants biologiquement actifs, tels que les gingérols, shogaols, paradols et zingérone (figure 13). Les proportions relatives de ces composants dans les extraits de gingembre sont déterminées par un certain nombre de facteurs, y compris l'origine géographique, la maturité des rhizomes au moment de la récolte, et la méthode par laquelle les extraits sont préparés.

Nous nous sommes limités dans cette étude aux principaux constituants du gingembre ayant une activité pharmacologique connue. Elle ne saurait être exhaustive (tableau 7).

**Tableau 7 :** Les principaux composants du gingembre (Faivre *et al*, 2006).

<b>Huiles volatiles</b>		
<b>Huile essentielle</b>	<b>Sesquiterpènes</b>	<p><b>Monoterpènes :</b> <math>\alpha</math>-pinène, camphène, <math>\beta</math>-pinène, myrcène, limonène, phellandrène</p> <p><b>Monoterpénols :</b> linalol, citronello</p> <p><b>Monoterpénals :</b> Citronnellal, myrténal, phellandral, néral, géranial</p> <p><b>Sesquiterpènes :</b> dont zingibérène, <math>\beta</math>-sesquiphellandrène, germacrène B, germacrène D, <math>\beta</math>-curcumène, ar-curcumène</p>
	<b>Alcools sesquiterpéniques</b>	Géranial, néral, citral, chavicol, esters acétique et caprylique, gingérol-6, alpha-curcumène.
	<b>Hydrocarbures aliphatiques et aromatiques</b>	Toluène, Alcools aliphatiques ( <i>butanol heptanol</i> ), Alcool cuminique, Aldéhydes aliphatiques ( <i>butanol, pentanol</i> ), Cétones aliphatiques ( <i>acétoneheptanone méthyl heptanone</i> )
<b>Composés piquants non volatiles</b>		
<b>Oléorésine</b>	<b>Diarylheptanoïdes</b>	<p>Gingerol, shogaol, zingérone, gingédiol, paradols. Ces composés ont une chaîne latérale de longueur variable de 7 à 16 carbones. Certains composés ne sont pas présents dans la drogue fraîche : les shogaols sont produits par la déshydratation des gingerols et seraient plus irritants et plus acres.</p> <p>Une autre catégorie de molécules ne se retrouve pas dans la drogue fraîche, ce sont les gingérones A et B <i>arylheptanoides</i> se développent au cours de la dessiccation.</p>



**Figure 13 :** Les majeurs constituants de gingembre (*Zingiber Offinale*) (Ali *et al*, 2008).

### 3.6. Propriétés pharmacologiques du gingembre.

#### 3.6.1. Action au niveau du tractus gastro-intestinal

❖ **Action antiémétique :** le gingembre réagit spécialement sur la modulation des récepteurs sérotoninergiques (type 5-HT<sub>3</sub>) (Yamahara *et al*, 1989), sur les récepteurs (NK1) par inhibition de la substance P (Qian *et al*, 2010); ainsi que sur les récepteurs muscariniques (Ghayar *et al*, 2007 ; Wu *et al*, 2008) :

- ✓ Stomachique par augmentation des sécrétions digestives.
  - ✓ Effet agoniste cholinergique direct sur les récepteurs post-synaptiques M<sub>3</sub>, par stimulation de la phospholipase C. L'acétylcholine entraîne une augmentation du tonus, du péristaltisme avec un accroissement de la motricité au niveau de l'œsophage, de l'estomac, du duodénum, de l'intestin grêle et du côlon. C'est l'action gastroprocinétique mise en évidence par les études cliniques en double aveugle.
  - ✓ Effet inhibiteur sur l'auto-récepteur muscarinique pré-synaptique (effets similaires aux antagonistes muscariniques) se caractérisant par la suppression des spasmes gastriques.
- ❖ **Action cholagogue :** il stimule la vidange biliaire (Spiridonov, 2012).
- ❖ **Action anti-ulcéreuse au niveau de la muqueuse gastrique :** par l'action antibactérienne sur *helicobacter pylori* (O'Mahony *et al*, 2005).

#### 3.6.2. Action anti-nauséuse du gingembre

❖ **Le gingembre et la nausée gravidique** l'OMS considère le gingembre efficace sur les nausées gravidiques. Plusieurs études ont montré la même action que la vitamine B6 avec absence d'effets secondaires et néfastes tant sur la grossesse que sur la mère (sécurité évaluée sur la mère, le fœtus et le nouveau-né (Ensiyeh et Sakineh, 2009 ; Ozgoli *et al*, 2009).

❖ **Le gingembre et la cinétose :** une étude a démontré qu'une dose de 940 mg de poudre de gingembre administrée 20 à 25 min avant de passer sur une chaise rotative est plus efficace que 100 mg de dimenhydrinate dans la prévention du mal des transports (Holtmann *et al*, 1989).

- ❖ **Le gingembre et la nausée postopératoires** : une dose de 1 g de gingembre en poudre administré une heure avant l'anesthésie est plus efficace qu'un placebo pour lutter contre les nausées et vomissements postopératoire (Chaiyakunapruk *et al*, 2006).
- ❖ **Le gingembre et la nausée chimio-induite** : la chimiothérapie peut provoquer d'importantes nausées, des vomissements et des douleurs abdominales très désagréables pour les patients. Ces problèmes sont notamment liés aux agents anticancéreux comme la cisplatine, le cyclophosphamide et le methotrexate qui ralentissent la vidange gastrique (Levine *et al*, 2008). Une étude récente réalisée en double aveugle confirme l'efficacité du gingembre utilisé en supplément d'une thérapie antiémétique dans un traitement de chimiothérapie émétogène (cisplatine/doxorubicine) (Pillai *et al*, 2011).
- ❖ **Le gingembre et les nausées digestives liées à une dyspepsie** : l'efficacité du gingembre sur l'accélération de la vidange gastrique est récemment confirmée dans une étude clinique réalisée en double aveugle chez des patients souffrant de dyspepsie fonctionnelle (Hu *et al*, 2011).

### 3.6.3. Action antilipémique et anti-athéromateuse

Abaissement du cholestérol sérique, hépatique et triglycéridémie. Il se pourrait que grâce à l'extrait de gingembre, les esters de cholestérol de la plaque aortique athéromateuse soient transformés en cholestérol libre et soient transportés par l'HDL vers le foie où a lieu leur catabolisme (Alizadeh-Navaei *et al*, 2008).

### 3.6.4. Action sur le diabète

Le diabète est un problème de santé publique de part ses complications cardiaques, rénales, ophtalmiques etc. Selon plusieurs études, le gingembre augmente la captation du glucose par les cellules musculaires indépendamment de l'insuline (Li *et al*, 2012).

### 3.6.5. Action anti-inflammatoire

Le gingembre a été montré pour exercer des effets anti-inflammatoires par :

- ✓ La diminution des douleurs musculaires, de l'œdème des articulations et amélioration de la mobilité chez des sujets souffrant d'arthrite ou d'ostéoarthrite (Altman et Marcussen, 2001).

- ✓ L'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes par l'inhibition des cyclo-oxygénase (COX-1, COX-2) et la 5-lipoxygénase LOX (Grzanna *et al*, 2005).
- ✓ L'inhibition de l'expression de TNF- $\alpha$  dans les synoviocytes et les chondrocytes activés (Phan *et al*, 2005).

### 3.6.6. Action sur le sang

Le gingembre a un effet anti-thrombotique par inhibition de l'agrégation plaquettaire et la production de thromboxane-B2 (TXB2) (Thomson *et al*, 2002).

### 3.6.7. Action sur le cœur et les artères

Le gingembre exerce des effets bénéfiques sur le système circulaire :

- ✓ Abaissement de la pression artérielle (Ghayar et Gilani, 2005).
- ✓ Effet cardiotonique par action inotrope positive chez le cobaye du 6-, 8- et 10-gingerol.
- ✓ L'oléorésine inhibe la synthèse du cholestérol (à l'instar des statines) en inhibant une enzyme, la HMG CoA réductase agissant sur la synthèse des stérols par la voie des mévalonates (Faivre *et al*, 2006).

### 3.6.8. Action antibactérienne, antifongique et mollucide

Le gingembre a des effets désinfectants :

- ✓ Antibactérien : *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* ; actif *in vitro* sur les rhinovirus ; l'extrait aqueux est efficace contre le trichomonas (Faivre *et al*, 2006 ; Ali *et al*, 2008).
- ✓ Antifongique : *Rhizopus sp.* (Ficker *et al*, 2003).
- ✓ Molluscide : Les gingérols et les shogaols ont une activité molluscide en particulier sur les vecteurs de la bilharziose (Faivre *et al*, 2006).
- ✓ Antihelminthique : nématodes gastro-intestinales (Iqbal *et al*, 2006).

### 3.6.9. Activité anticancéreuse

Des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont montré que le 6-gingérol est actif dans la prévention et le traitement des cancers : de la prostate, des ovaires, gastrique, colorectal par son action apoptotique et antiangiogénique (Ishiguro *et al*, 2007 ; Rhode *et al*, 2007 ; Lee

*et al*, 2008<sup>a</sup>). Il s'oppose aussi à la formation de métastases dans le cancer du sein (Lee *et al*, 2008<sup>b</sup>). L'application locale de son huile essentielle a montré un effet protecteur contre l'infection de l'herpès génital (type 2) et une efficacité *in vitro* sur des bactéries pathogènes (Norajit *et al*, 2007).

### 3.7. Effet toxicologique du gingembre

Comme toute substance active, le gingembre peut, chez certaines personnes, entraîner des effets plus ou moins gênants et transitoires (Chrubasik *et al*, 2005) :

- ✓ Irritation gastrique et crampes intestinales par surdosages.
- ✓ L'inhalation de la poussière de gingembre peut entraîner la production des IgE allergiques.
- ✓ Le gingembre est déconseillé en cas de lithiase biliaire et obstruction des voies biliaires.

#### 3.7.1. Posologie

La posologie dépend de l'affection traitée et de la forme utilisée, le tableau suivant illustre les différentes posologies conseillées pour le gingembre.

**Tableau 8** : les différentes posologies conseillées pour le rhizome de gingembre (Faivre *et al*, 2006).

Forme du rhizome	Dose d'administration
<b>Racine sèche</b>	Infusion de 1 g pour 150 ml
<b>Poudre</b>	De 0,5 à 1,5 g/jour
<b>Extrait fluide</b>	De 0,6 à 1,8 g/jour ou 1 à 5 ml en 3 ou 4 fois par jour
<b>Extrait sec</b>	3 ou 4 fois 250 mg d'extrait sec aqueux par jour
<b>Teinture mère</b>	De 1,2 à 7,8 g/jour
<b>Jus de rhizome frais</b>	De 5 à 10 ml par jour
<b>Huile essentielle</b>	De 2 à 4 gouttes avant les repas dans un demi-verre d'eau chaude ou de tisane de plante digestive.

### 3.7.2. Attention à l'automédication !

La phytothérapie est une thérapeutique souvent peu toxique mais qui exige un certain nombre de précautions (Roux, 2005) :

- ✓ Une bonne connaissance des plantes car certaines peuvent être toxiques et nécessiter une prescription médicale ;
- ✓ Une connaissance approfondie de la pharmacologie (devenir des principes actifs dans l'organisme) ;
- ✓ Etre attentif aux doses, en particulier pour les jeunes enfants, les femmes enceintes ou allaitant et les personnes âgées ;
- ✓ Un arrêt du traitement en cas de réactions allergiques, plaques rouges, démangeaisons, gêne respiratoire, etc. ;
- ✓ Certaines plantes ne peuvent être utilisées en même temps que d'autres médicaments ou présentent une certaine toxicité si le dosage est augmenté ou si le temps de traitement est prolongé.

---

*PARTIE EXPERIMENTALE*

---

## *Quatrième chapitre : Matériels & méthodes*

### *❖ Matériels*

- Produit chimique et préparations de gingembre*
- Entretien et traitement des animaux*
- Prélèvements (sanguin et des organes)*

### *❖ Méthodes*

- FNS et méthémoglobine*
- Glycémie*
- Urée, acide urique et créatinine*
- ASAT, ALAT, PAL, LDH, BT et BD*
- MDA, GSH, GSH-Px, GSH-ST et CAT*
- Coupes histologiques (foie & rein)*

### *❖ Analyse statistique*

## 4. Matériels et Méthodes

### 4.1. Matériels

#### 4.1.1. Produit chimique

Nous avons utilisé le nitrate d'ammonium pur provenant de la firme pharmaceutique (Fluka, Macédoine). Il a été solubilisé dans l'eau minérale en deux concentrations différentes (400 - 600 mg/kg) et administrées aux rats par gavage oral (*per os*) (Boukerche *et al*, 2007).

#### 4.1.2. Préparation de la poudre de gingembre

Les rhizomes de gingembre frais (*Zingiber Offinale*), achetés au marché local (importé de la Chine), lavés, épluchés, coupés en petits morceaux, séchés à l'air et à l'abri du soleil. À l'aide d'un mixeur le produit de séchage a été transformé en poudre très fine, puis conservé dans des récipients hermétiques à une température ambiante jusqu'à la préparation du régime expérimental. Ce gingembre diététique a été donné aux rats à raison de 2% (Shanmugam *et al*, 2011).

#### 4.1.3. Entretien et traitement des animaux

Pour cette étude nous avons réceptionné cinquante rats mâles (*Albino wistar*), de l'Institut Pasteur d'Alger (I.P.A.), âgés de 12 semaines. L'élevage des rats a été effectué au niveau de l'animalerie de l'Université Badji Mokhtar - Annaba. Les animaux étaient hébergés dans des cages en polyéthylène munies d'étiquettes où sont mentionnés le nom du lot, le traitement subit et les dates des expérimentations, les cages sont tapissées d'une litière en copeaux de bois nettoyées quotidiennement.

Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de (22 ± 2°C) et une photopériode naturelle (12/12 H). Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré que nous avons préparé selon le régime d'Upreti *et al* (1989) et l'eau *ad libitum* (tableau 9). Le poids vif moyen des rats au début de l'expérimentation est environ 200 g ± 10 g.

**Tableau 9** : Composition du régime alimentaire (Upreti *et al*, 1989)

Matière	Quantité (g/kg)	Pourcentage (%)
Maïs	420	42.0
Saccharose	210	21.0
Soja	260	26.0
Son	60.0	6.00
C.M.V.	30.0	3.00
Huile	20.0	2.00

Après une période d'accoutumance, les animaux ont été repartis au hasard en cinq groupes de dix rats chacun. En plus d'une nourriture simple et d'eau potable, du nitrate d'ammonium en gavage et/ou du gingembre à des proportions définies auparavant ont été présentés pendant 30 jours (N mg/kg + G %).

Les différents traitements des rats sont comme suit :

- Lot 1 (T)** : groupe témoin, les rats reçoivent une eau potable et une nourriture simple (0 + 0).
- Lot 2 (G)** : les rats reçoivent une eau potable et une nourriture contenant 2 % de la poudre de gingembre (0 + G).
- Lot 3 (N)** : En plus d'une eau potable et une nourriture simple les rats reçoivent par gavage 400 mg/kg de nitrate d'ammonium (N + 0).
- Lot 4 (N+G)** : les rats reçoivent par gavage 400 mg/kg nitrate d'ammonium plus 2% de gingembre dans leurs régimes alimentaires (N + G).
- Lot 5 (N\*+G)** : ce dernier groupe est traité par une dose plus élevée de nitrate d'ammonium (600 mg/kg) en plus de 2% de poudre de gingembre dans leurs régimes alimentaires (N\* + G).

#### 4.1.4. Prélèvement sanguin

Les rats sont sacrifiés par décapitation ; le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes étiquetés, l'un sec et l'autre contient l'EDTA comme anticoagulant :

- ✓ Les tubes à EDTA serviront pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS) et le pourcentage de méthémoglobine.
- ✓ Les tubes secs sont centrifugés à 5000 tours/minute pendant 15 minutes, les sérums récupérés serviront à la détermination des paramètres biochimiques (acide urique, urée, créatinine, cholestérol, triglycéride, lipides totaux, bilirubine total et direct, phosphatase alcaline, transaminase ASAT/ALAT, lactate déshydrogénase).

#### **4.1.5. Prélèvement des certains organes**

Une ouverture abdominale longitudinale pour le prélèvement des différents organes (cœur, foie, rate, intestins, reins et testicules). Une fois débarrassé de leurs tissus adipeux, les organes sont pesés excepté les intestins. Un fragment de foie et de rein de chaque lot sont fixés séparément dans le Bouin alcoolique afin de réaliser des coupes histologiques, le reste des organes sont conservés au congélateur à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant (GSH, MDA, GPx, GST, CAT). La figure suivante résume les différentes étapes du protocole expérimental.



**Gingembre frais**



**Gingembre en poudre**



**Animalerie**



**Cage étiquetée**



**Gavage des rats**



**Prélèvement des organes**

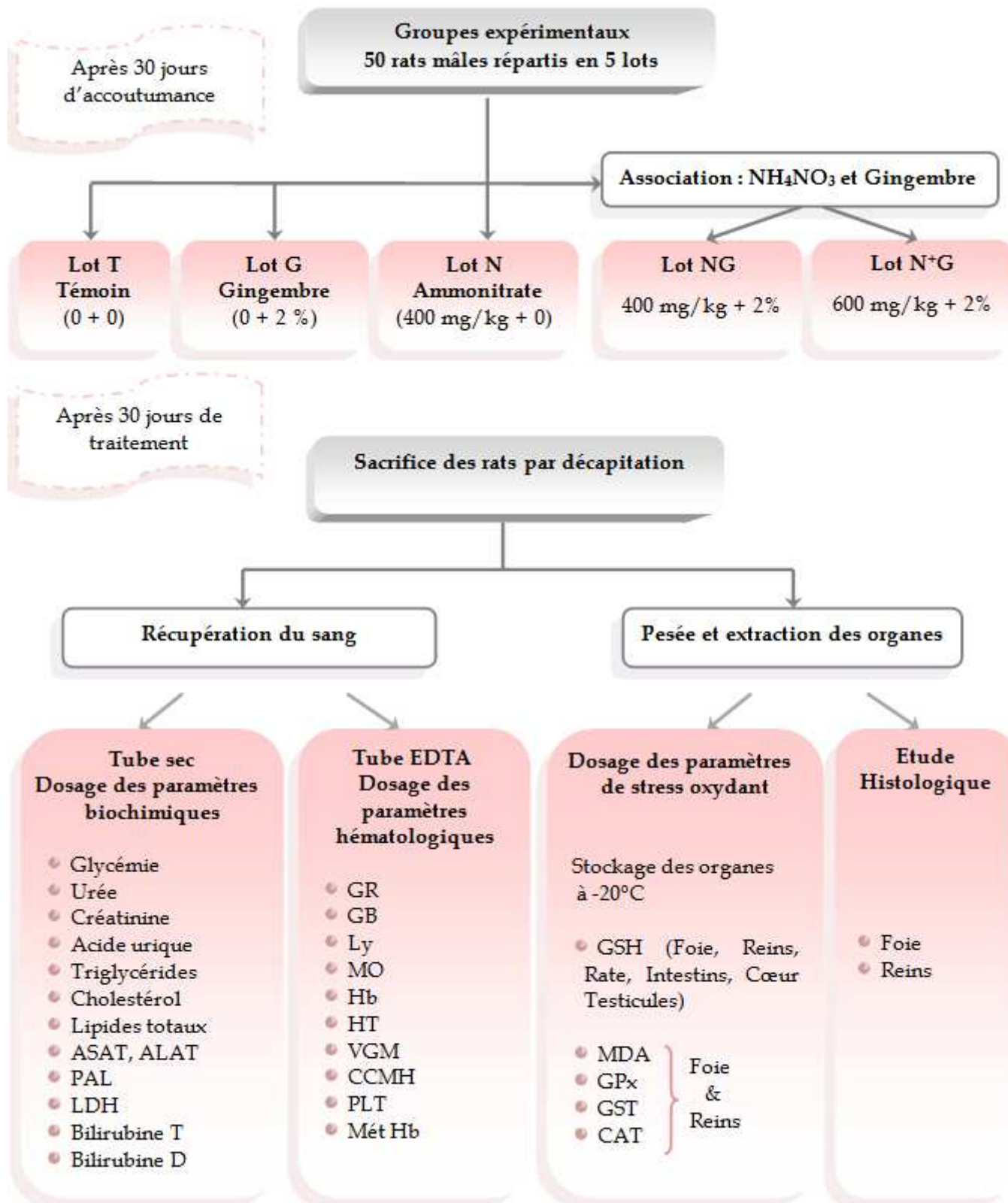


Figure 14 : Les différentes étapes du Protocole expérimental

## 4.2. Méthodes

### 4.2.1. Dosage des paramètres hématologiques

La formule de numération sanguine (FNS) a été réalisée par l'analyseur ERMA INC (full automatic blood cell counter model PCE-210N). Le tube de sang total avec l'EDTA (anticoagulant) est placé dans l'automate ; et la mesure de la FNS commence. Les résultats s'affichent automatiquement sur l'écran, et sont ensuite imprimés. Les paramètres déterminés sont : globule rouge (GR), globule blanc (GB), hémoglobine (Hb), hématocrite (HT), plaquettes (PLT), lymphocytes (LY), monocytes (MO), volume globulaire moyen des hématies (VGM) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). Concernant la méthémoglobine, le dosage a été réalisé au niveau du laboratoire de toxicologie (Hôpital Ibn Sina) suivant la méthode d'Evelyne et Malloy (1938).

### 4.2.2. Dosage des paramètres biochimiques

#### 4.2.2.1. Mesure de la glycémie

**Principe :** le dosage du glucose sanguin a été effectué par un glucomètre qui utilise des bandelettes réactives. Ces dernières sont destinées à un usage diagnostique *in vitro* (externe) pour le test de la glycémie. Elles sont conçues pour mesurer le glucose dans le sang total capillaire. La bandelette réactive contient de la glucose-oxydase, une enzyme qui oxyde le glucose dans le sang et qui produit de l'acide D-gluconique et du peroxyde d'hydrogène.

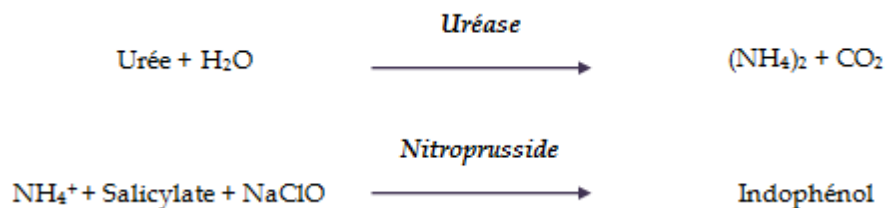
#### Mode opératoire

- ✓ Le lecteur se met en marche automatiquement par simple insertion de la bandelette réactive Accu-Chek (dans le sens des flèches et jusqu'à la butée).
- ✓ Le symbole d'une goutte clignote.
- ✓ Déposer la goutte de sang sur la zone de dépôt orange de la bandelette. Le résultat s'affiche en 5 secondes. La glycémie est donnée en g/dl.

Les bilans : rénal, lipidique et hépatique sont réalisés selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne). Les protocoles expérimentaux seront expliqués en détails dans l'annexe.

#### 4.2.2.2. Mesure de l'urée

**Principe :** la technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode enzymatique utilisant l'uréase selon la réaction suivante :



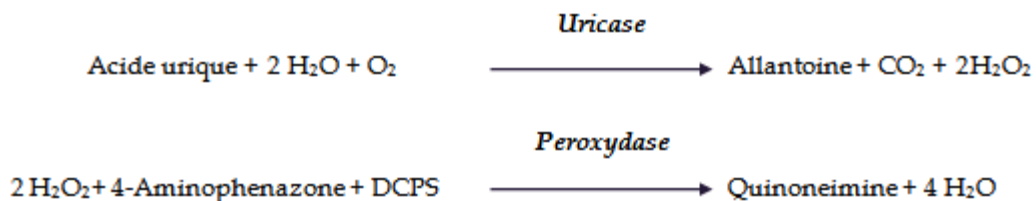
Les ions d'ammonium peuvent réagir avec le salicylate et l'hypochlorite de sodium pour former un complexe coloré en vert, l'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée présentée dans l'échantillon (sérum) (Fawcett et Scott, 1960).

#### 4.2.2.3. Mesure de la créatinine

**Principe :** la créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (sérum) (Murray, 1984<sup>a</sup>).

#### 4.2.2.4. Mesure de l'acide urique

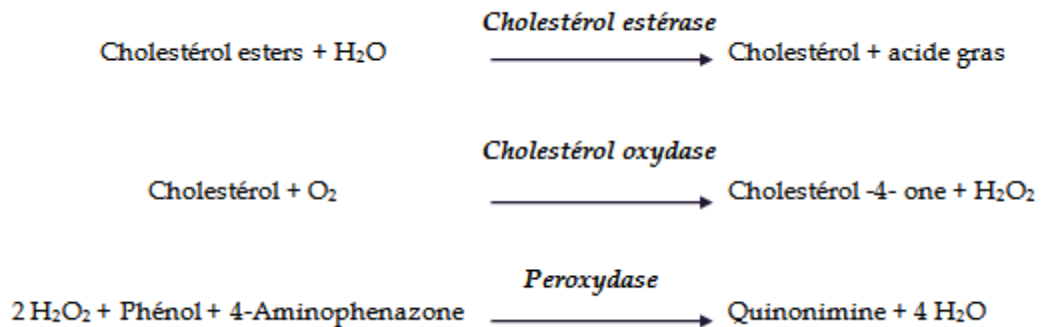
**Principe :** l'acide urique présent dans l'échantillon donne selon la réaction décrite ci-dessus un complexe coloré, quantifiable par spectrophotométrie :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon (sérum) (Schultz, 1984).

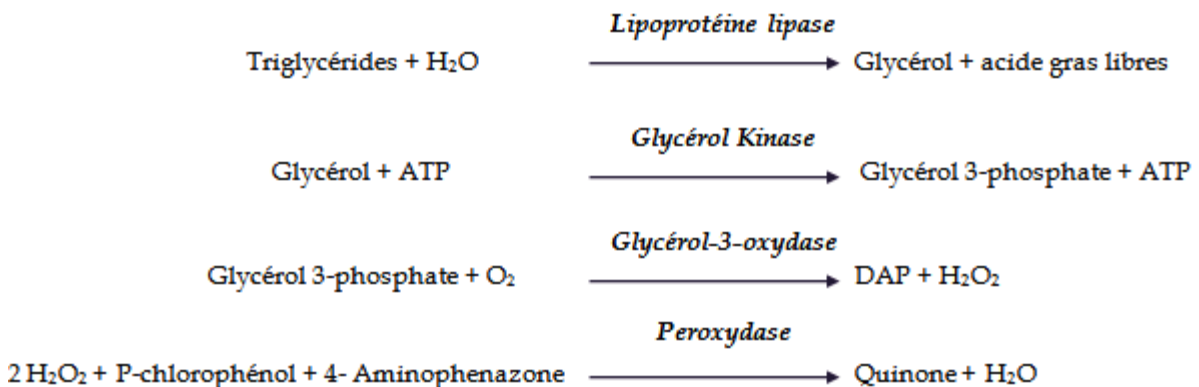
#### 4.2.2.5. Mesure du cholestérol

**Principe :** le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon la réaction ci-dessous, L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (sérum) (Naito, 1984).



#### 4.2.2.6. Mesure de triglycéride

**Principe :** les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré, l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (sérum) (Buccolo *et al*, 1973).



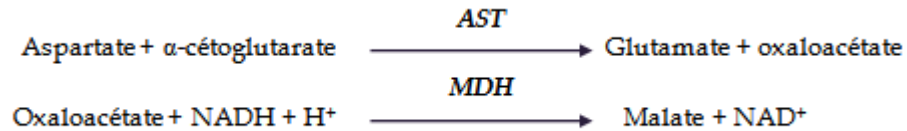
#### 4.2.2.7. Mesure des lipides totaux

**Principe :** les lipides totaux avec la phosphovainilline et en présence de l'acide sulfurique forment un complexe coloré, l'intensité de sa couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux dans l'échantillon (sérum) (Cottet *et al*, 1965).

#### 4.2.2.8. Mesure de l'aspartate aminotransférase (ASAT / GOT)

**Principe :** l'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi oxaloacétate de glutamate

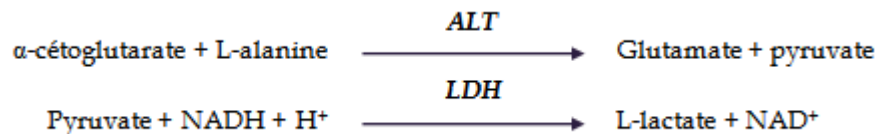
(GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup>.



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'aspartate aminotransférase dans l'échantillon (sérum) (Murray, 1984<sup>b</sup>).

#### 4.2.2.9. Mesure de l'alanine aminotransférase (ALAT/GPT)

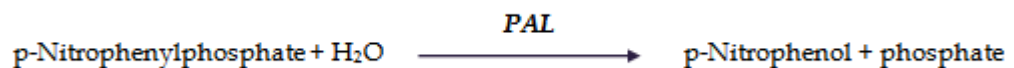
**Principe :** le principe est présenté selon le schéma réactionnel suivant :



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (sérum) (Murray, 1984<sup>c</sup>).

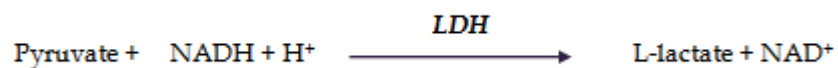
#### 4.2.2.10. Mesure de la phosphatase alcaline (PAL)

**Principe :** la phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10,4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate. La formation de p-nitrophénol est mesurée par spectrophotométrie, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon (sérum) (Wenger *et al*, 1984).



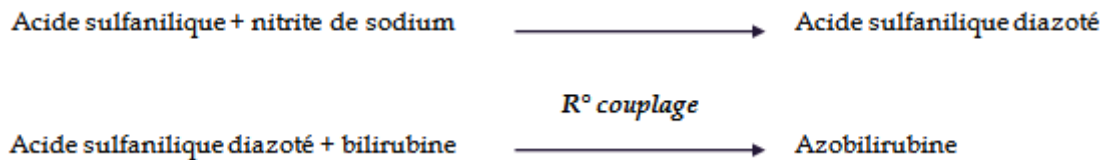
#### 4.2.2.11. Mesure du lactate déshydrogénase (LDH)

**Principe :** la détermination cinétique de l'activité enzymatique de (LDH) basée sur la réaction citée ci-dessous. Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de LDH dans l'échantillon (Pesce, 1984).



#### 4.2.2.12. Mesure de la bilirubine directe et totale

**Principe :** la bilirubine est définie comme la quantité de pigment dans le sérum réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine quantifiable par spectrophotométrie.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (sérum) (Kaplan *et al*, 1984).

#### 4.2.3. Dosage des paramètres du stress oxydant

##### 4.2.3.1. Mesure du malone-dialdéhyde (MDA)

**Principe :** le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par certains contaminants. Dans notre étude, les taux du MDA hépatique et rénal ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa *et al* (1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

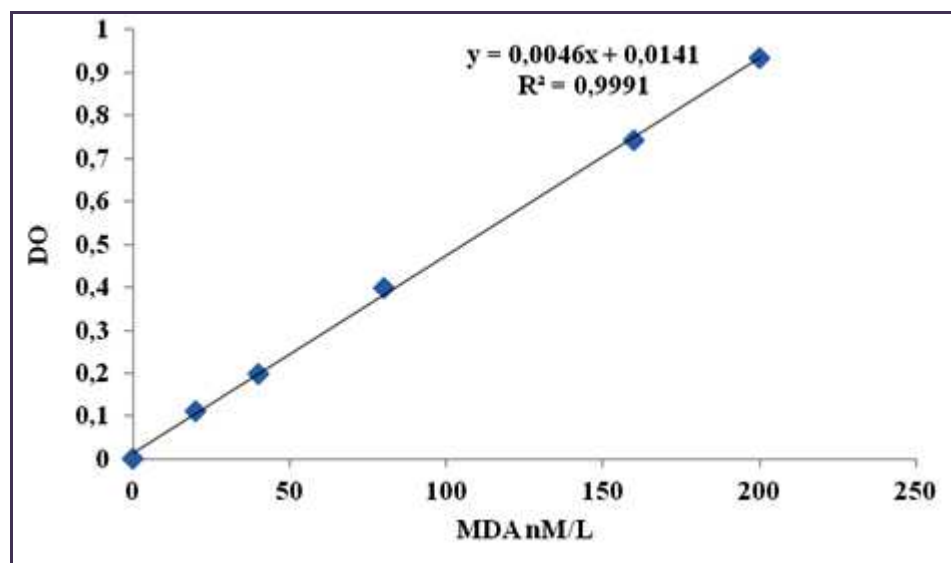
**Préparation de l'homogénat :** 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4) pour obtenir un homogénat.

##### Mode opératoire

- ✓ Prélever 0,5 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 %.
- ✓ Ajouter 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %.
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 100 °C durant 15 min.
- ✓ Refroidir et additionner 4 ml de *n*-butanol.
- ✓ Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min.

- ✓ Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

**Calcul de la concentration du MDA :** la quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de tissu (foie ou reins). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions (figure 15).



**Figure 15 :** Courbe standard pour le calcul d'MDA

#### 4.2.3.2. Mesure du Glutathion réduit (GSH)

**Principe :** le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Wekbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

**Préparation de l'homogénat :** 200 mg de tissu (cœur, foie, rate, intestins, reins et testicules) ont été mis en présence de 8 mL d'une solution d'Acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason pour obtenir un homogénat.

**Mode opératoire**

- ✓ Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- ✓ Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique 0,25 %.
- ✓ Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✓ Prélever 0,5 ml du surnagent.
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris + EDTA (0.02 M d'EDTA), pH 9,6.
- ✓ Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- ✓ Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- ✓ Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

**Calcul :** la concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante

$$[\text{GSH}] \text{ (nM GSH/mg protide)} = (\text{DO} \times 1 \times 1,525) / (13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protide})$$

**DO** : Densité optique à 412 nm.

**1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml SSA).

**1.525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH (0,5 ml surnagent + 1 ml Tris EDTA + 0,025 ml DTNB).

**13100** : Coefficient d'absorbance du groupement (-SH) à 412 nm.

**0.5** : Volume du surnagent trouvé dans 1,525 ml.

**0.8** : Volume de l'homogénat trouvé dans 1 ml.

On note que la concentration du GSH est mesurée par rapport à 1 mg de protéines. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

**4.2.3.3. Mesure de l'activité enzymatique du Glutathion Peroxydase (GPx)**

**Principe :** L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de

peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



**Préparation de l'homogénat :** 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) pour obtenir un homogénat.

### Mode opératoire

- ✓ Prélever 0,2 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM).
- ✓ Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✓ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ✓ Ajouter 0,2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir 10 minutes.
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✓ Prélever 0,48 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- ✓ Ajouter 0,32 ml de DTNB (1,0 mM)
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

**Calcul :** la détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide des formules suivantes :

$$X = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH} / \text{mg protéine}) = \frac{\text{Quantité GSH disparu}}{[\ ] \text{ de protéine}}$$

- X** : Quantité de GSH réduit disparu (oxydé) dans 0.2 ml extrait dans 1 ml.
- DO échantillon** : Densité optique de l'échantillon.
- DO étalon** : Densité optique de l'étalon.
- 0.04** : Concentration de substrat (GSH).

#### 4.2.3.4. Mesure de l'activité enzymatique du Glutathion S-Transférase (GST)

**Principes** : la mesure de l'activité des GST a été réalisée par la méthode de Habig *et al* (1974), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général le 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm, la variation de la densité optique est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes.

**Préparation de l'homogénat**: 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), pour obtenir un homogénat.

#### Mode opératoire

Les réactifs utilisés	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1M, pH 6.5)	850	830
CDNB (0.02M)	50	50
GSH (0.1M)	100	100
Homogénat	-	20

**Calcul** : la concentration de la GST est obtenue par la formule suivante

$$\text{GST (nmol GST / min / mg protéine)} = \frac{(\text{DO échantillon / min} - \text{DO blanc / min})}{9.6 \times \text{mg protéine}}$$

**DO échantillon / min** : Densité optique de l'échantillon par minute

**DO blanc / min** : Densité optique du blanc par minute

**9.6** : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$

#### 4.2.3.5. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)

**Principe** : la méthode utilisée est celle d'Aebi (1984). L'activité catalase a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la diminution du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 25°C en présence d'une source enzymatique dans la fraction cytosolique.

**Préparation du surnageant** : 500 mg de foie ou de rein des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M. pH 7.4). La suspension cellulaire est centrifugée à 9000 tours/min pendant 15 minutes et à une température de 4°C.

#### Mode opératoire

Les réactifs utilisés	Blanc ( $\mu\text{l}$ )	Essai ( $\mu\text{l}$ )
Tampon phosphate (0,1 M. pH 7,5)	800	780
$\text{H}_2\text{O}_2$ (0,5 M)	200	200
Surnageant (S9)	-	20

On note que :

- ✓ Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.
- ✓ La quantité des S9 doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui est comprise entre 1 et 1,5 mg/ml.
- ✓ L'activité de la catalase décroît rapidement, il est important de respecter le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- ✓ La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

**Calcul :** l'activité de la catalase est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg protéine}) = \frac{\Delta \text{DO} \times 10}{\varepsilon \times L \times X \times \text{Fd}}$$

$\Delta \text{DO}$  : Variation de la densité optique par minutes

$\varepsilon$  : Coefficient d'extinction du  $\text{H}_2\text{O}_2$  =  $0.04 \text{ Mm}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$

$L$  : Longueur de la cuve = 1 Cm

$X$  : Quantité de protéine en mg/ml

$\text{Fd}$  : Facteur de dilution du  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le tampon (0,02)

#### 4.2.4. Dosages des protéines

**Principe :** la concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Les groupements amines ( $-\text{NH}_2$ ) des protéines réagissent avec un réactif à base de l'acide orthophosphorique, de l'éthanol et de bleu de Coomassie pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines dans l'échantillon.

#### Mode opératoire

- ✓ Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- ✓ Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- ✓ Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.
- ✓ La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (figure 16).

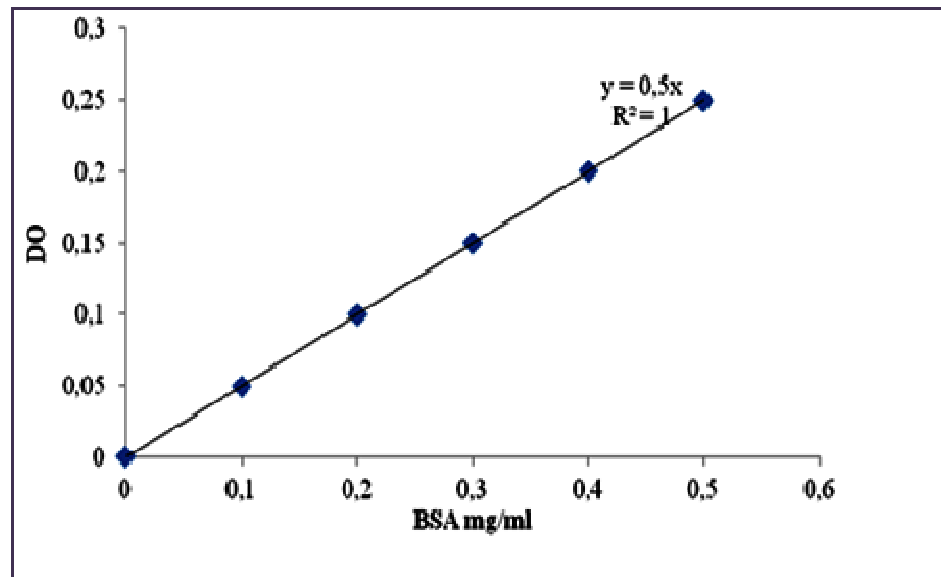


Figure 16 : Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin

#### 4.2.5. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologie au niveau de l'Hôpital Ibn Rochd - Annaba. La technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984), qui comporte les étapes suivantes :

**4.2.5.1. Fixation :** elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après la décapitation des rats et prélèvement des organes. Des fragments de foie et de rein (de surface 1 à 2 cm<sup>2</sup> et d'épaisseur 2 mm) ont été mis dans le fixateur (Bouin alcoolique), il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées du Bouin puis rincées à l'eau distillée. Des coupes transversales faites par l'anatomopathologiste. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent :

**4.2.5.2. Déshydratation :** comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on

assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 95 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

**4.2.5.3. Inclusion et réalisation des blocs :** elle ne peut être satisfaisante que si l'échantillon est complètement déshydraté et ne contient plus de solvant intermédiaire (alcool). Les pièces sont plongées (2 heures) dans des bains de paraffine liquide fondue à 60° C. Les échantillons étant imbibés de paraffine sont placés dans des moules appelés les barres de Leuckart, puis sont remplis de paraffine. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour aboutir à la solidification rapide (10 à 15 min) du bloc de paraffine contenant le tissu.

**4.2.5.4. Confection des coupes :** les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis déplissés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont marquées au nom des différents lots à l'aide d'un crayon d'argent, ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

**4.2.5.5. Coloration et montage :** il existe plusieurs méthodes de coloration qui varient en fonction des tissus. La méthode de l'Hématéine-Eosine (HE) est la plus utilisée. La coloration suit les étapes suivantes :

- ✓ Déposer les coupes dans un bain de xylène pendant 10 minutes afin de déparaffiner les échantillons et faire pénétrer les colorants.
- ✓ La réhydratation des coupes se fait par passage dans un bain d'éthanol pendant 10 minutes puis hydrater les lames par l'eau du robinet.

- ✓ Immerger les coupes dans un bain d'Hématéine (10 minutes) qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux cellulaires). Rincer à l'eau courante.
- ✓ Le deuxième colorant utilisé est l'éosine qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasmes cellulaires). Rincer à l'eau courante.

Le montage consiste à fixer une lamelle en verre sur les coupes histologiques après coloration. Cette étape permet la :

- ✓ protection mécanique des coupes.
- ✓ protection chimique des colorants.

Sécher les lames puis observer au microscope optique équipé d'un appareil photographique.



**Fixation dans le Bouin**



**Coupe transversale**



**Cassette**



**Circulateur**



**Appareil à inclusion**



**Moule Leukart**



**Réalisation d'un bloc**



**Plaque réfrigérée**



*Solidification du bloc*



*Dégrossir un bloc*



*Réalisation d'un ruban*



*Lames sur plaque chauffante*



*Bacs de coloration*



*Lame colorée*

### **4.3. Analyse statistique des résultats**

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type moyen ( $M \pm SD$ ), Ces moyennes sont comparées par un test *t* de Student grâce au logiciel MINITAB (version 13.31). Les différences sont considérées comme :

- ✓ Significatives lorsque (\*P < 0,05).
- ✓ Hautement significative comparant au témoin (\*\*P < 0,01).
- ✓ Très hautement significative comparant au témoin (\*\*P < 0,001).

Avec P : Seuil de signification.

## *Cinquième chapitre : Résultats*

- ❖ *Etude pondérale*
- ❖ *Etude hématologique*
- ❖ *Etude biochimique : bilans (lipidique, hépatique & rénal)*
- ❖ *Statut antioxydant & marqueurs de stress oxydant*
- ❖ *Etude histologique*

## 5. RESULTATS

### 5.1. Etude pondérale

#### 5.1.1. Influence du traitement sur la croissance corporelle

La figure 17 représente la variation de poids corporel des rats témoins et traités quotidiennement pendant 30 jours par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre. Les résultats obtenus ne montrent aucun changement significatif sur la croissance physiologique des rats traités en comparaison avec le groupe témoin. La ration alimentaire n'a pas changé et les rats ont gardé un appétit normal ce qui a conservé leurs poids.

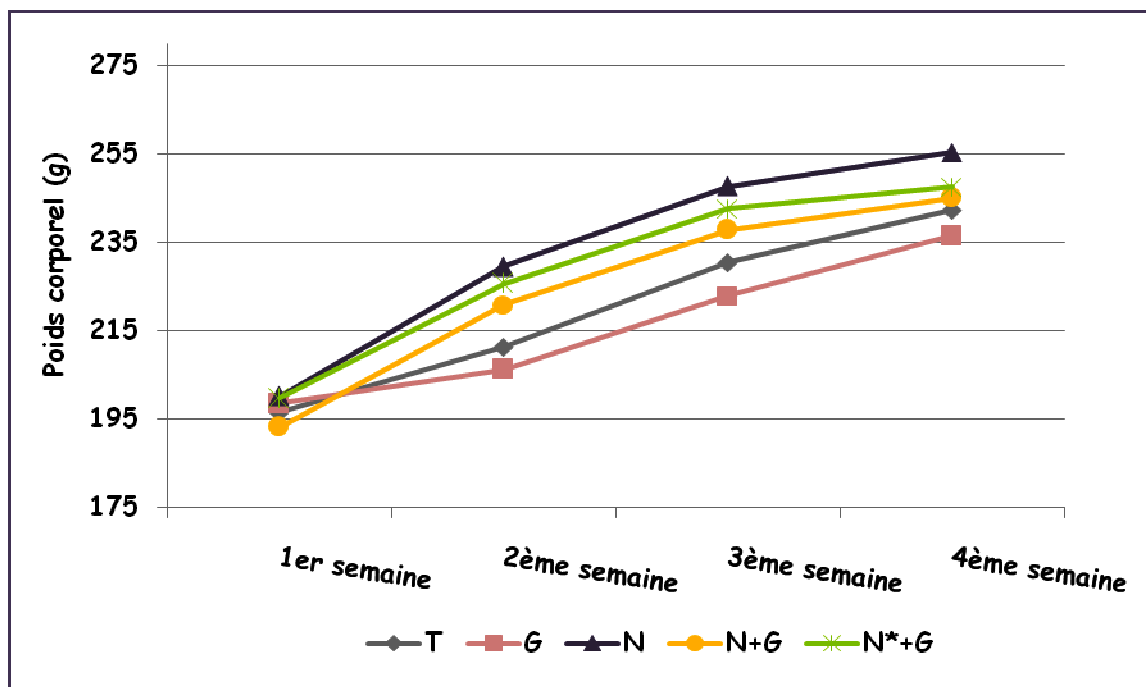
#### 5.1.2. Influence du traitement sur les rapports organo-corporels

L'étude statistique de la variation des poids des organes par rapport à 100 g du poids corporel objective une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) du rapport hépato-corporel chez les rats traités par 400 mg/kg de nitrate d'ammonium (N+0) et une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du rapport spléno-corporel chez les rats traités par 600 mg/kg de nitrate d'ammonium et le gingembre (N\*+G). En l'occurrence les rapports réno-corporel, cardio-corporel, testi-corporel sont restés intacts comparés au groupe témoin (tableau 10, figure 18).

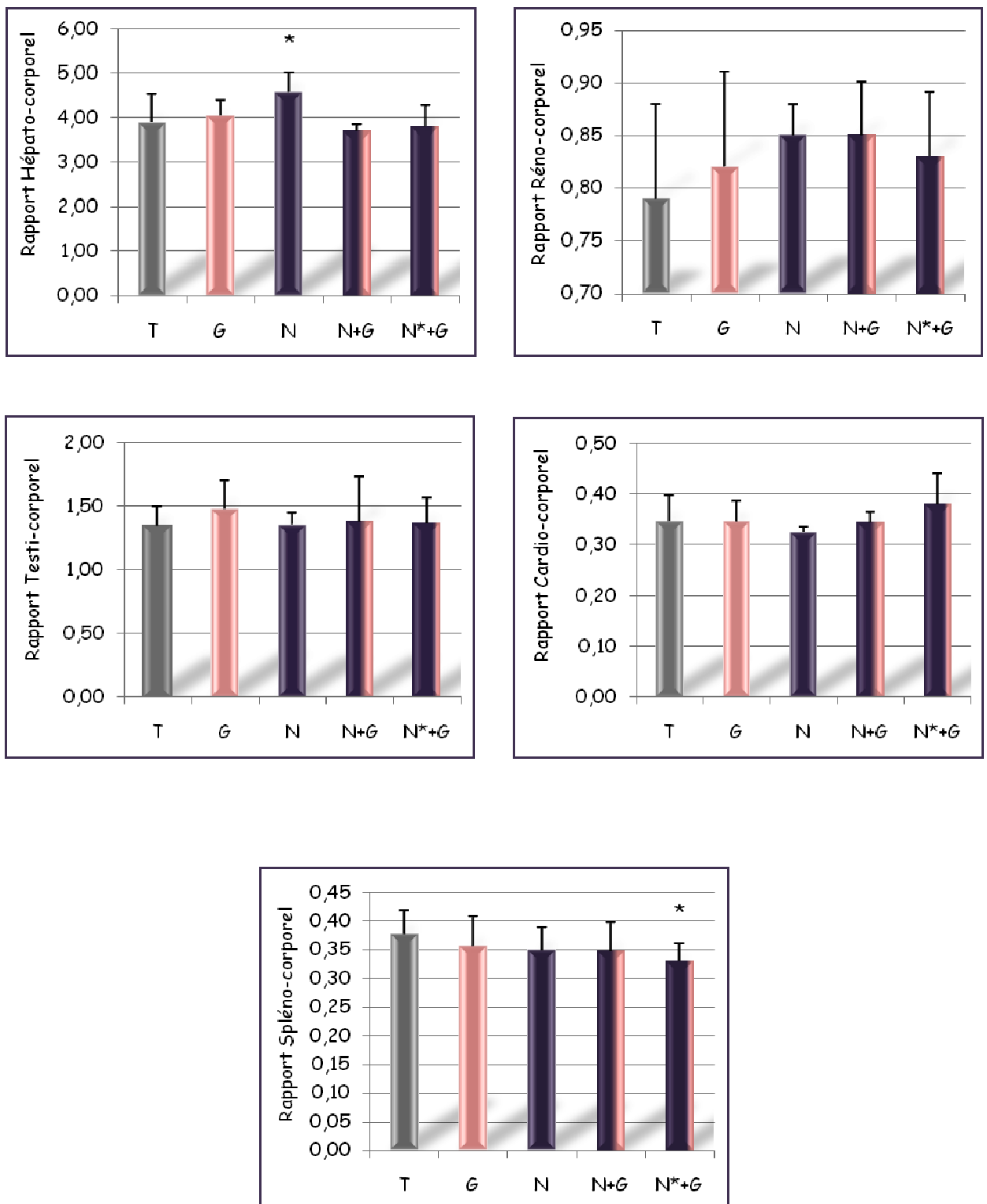
**Tableau 10 : Variation du poids corporel et des rapports organo-corporels chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et / ou le gingembre pendant 30 jours.**

Paramètres	Lots expérimentaux				
	T (0 + 0)	G (0 + 2%)	N (400 mg/kg + 0)	N+G (400 mg/kg + 2%)	N+G (600 mg/kg + 2%)
Poids initial	(g) 196,50 ± 24,9	198,50 ± 23,8	200,10 ± 17,0	193,13 ± 12,2	199,66 ± 15,5
Poids final	(g) 242,37 ± 28,8	236,44 ± 28,8	255,38 ± 22,2	245,10 ± 28,2	247,55 ± 21,6
Gain de poids	(g) 45,87	37,94	55,17	51,97	47,89
Rapport hépato-corporel	(%) 3,880 ± 0,630	4,040 ± 0,344	4,572 ± 0,443*	3,699 ± 0,153	3,798 ± 0,482
Rapport réno-corporel	(%) 0,795 ± 0,097	0,824 ± 0,093	0,850 ± 0,036	0,853 ± 0,050	0,830 ± 0,066
Rapport spléno-corporel	(%) 0,377 ± 0,043	0,356 ± 0,053	0,348 ± 0,043	0,347 ± 0,589	0,333 ± 0,033*
Rapport cardio-corporel	(%) 0,347 ± 0,050	0,346 ± 0,044	0,325 ± 0,016	0,344 ± 0,020	0,380 ± 0,067
Rapport testi-corporel	(%) 1,341 ± 0,151	1,476 ± 0,224	1,348 ± 0,098	1,377 ± 0,358	1,363 ± 0,208

\* : Différence significative par rapport au témoin (P < 0.05).



**Figure 17 :** Variation du poids corporel chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.



**Figure 18 :** Variation des rapports organo-corporels chez les rats témoins et traités par le nitrate d’ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.

## 5.2. Etude hématologique

Nos résultats révèlent que le traitement des rats par le nitrate d'ammonium provoque une diminution significative ( $p < 0,05$ ) des globules rouges, globules blancs, hémoglobine ainsi que le volume globulaire moyen. De plus nous avons enregistré une diminution très hautement significative ( $p < 0,001$ ) de l'hématocrite. En revanche, une augmentation très hautement significative ( $p < 0,001$ ) a été signalée au niveau de la méthémoglobine par rapport au groupe témoin.

Cependant, la supplémentation du gingembre dans la diète des rats (N+G) a rétabli les paramètres cités ci-dessus en comparaison avec le groupe témoin. Le nitrate d'ammonium avec la dose supérieure (600 mg/kg) provoque une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'hématocrite et une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) au pourcentage de la méthémoglobine, bien que les rats soient nourris par une diète supplémentée par 2% de gingembre (N\*+G) en comparaison au groupe témoin.

Le tableau 11 et la figure 19 illustrent les changements numériques des éléments sanguins chez les rats traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre :

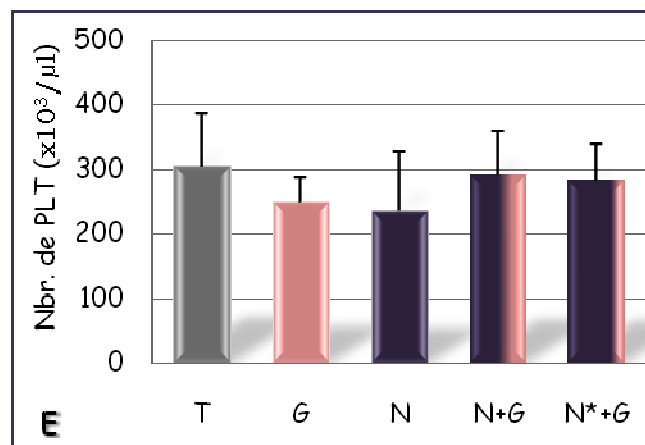
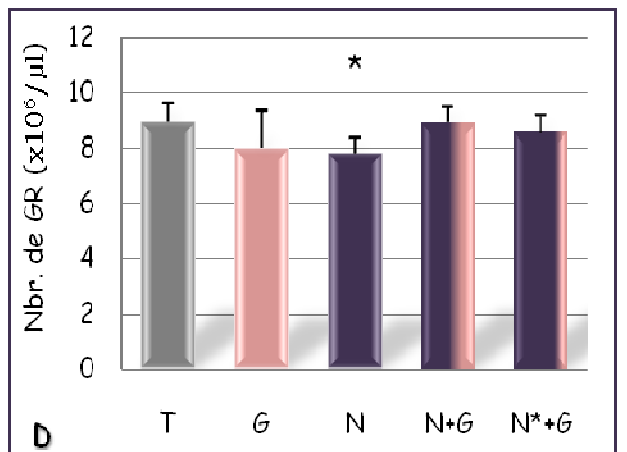
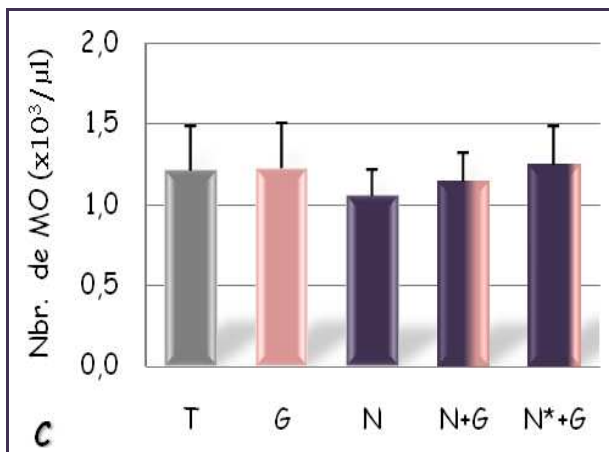
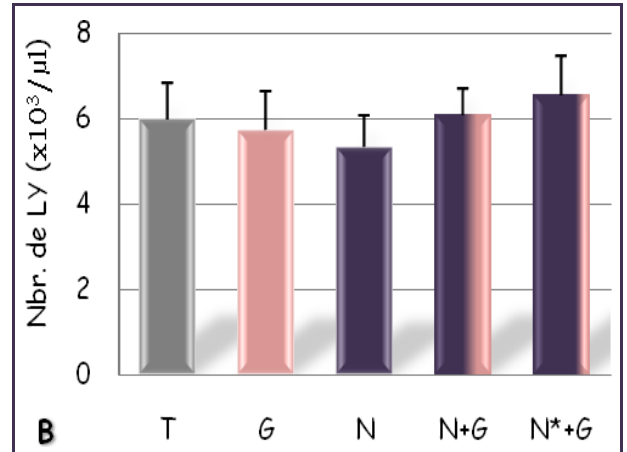
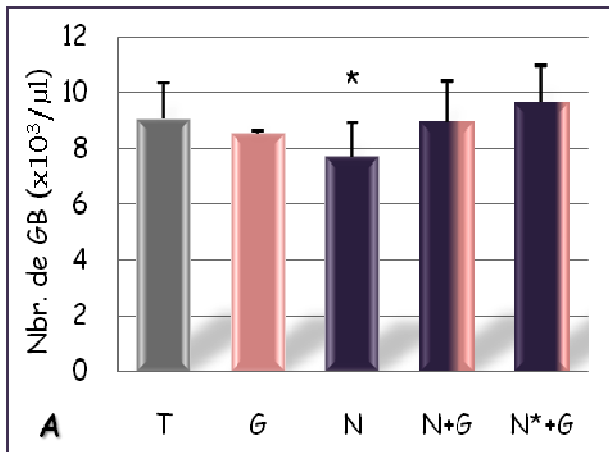
**Tableau 11 :** Variation des paramètres hématologiques chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et /ou le gingembre pendant 30 jours.

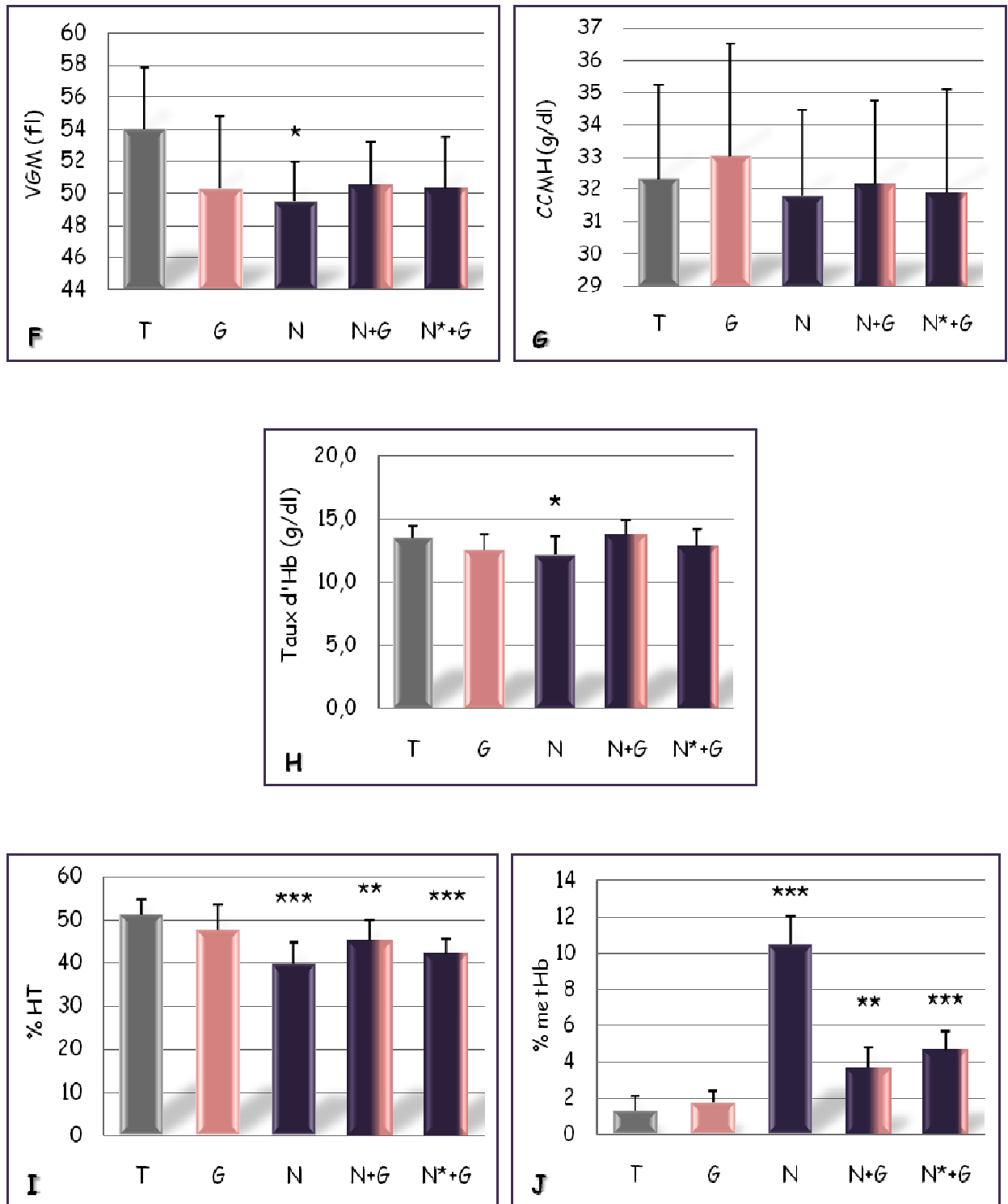
Paramètres	Lots expérimentaux				
	T (0 + 0)	G (0 + 2%)	N (400 mg/kg + 0)	N+G (400 mg/kg + 2%)	N*+G (600 mg/kg + 2%)
GB ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9,07 $\pm$ 1,26	8,54 $\pm$ 0,80	7,68 $\pm$ 1,22*	8,96 $\pm$ 1,41	9,66 $\pm$ 1,26
LY ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5,98 $\pm$ 0,84	5,72 $\pm$ 0,90	5,32 $\pm$ 0,74	6,08 $\pm$ 0,61	6,54 $\pm$ 0,92
MO ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1,21 $\pm$ 0,27	1,22 $\pm$ 0,28	1,05 $\pm$ 0,16	1,14 $\pm$ 0,17	1,24 $\pm$ 0,24
GR ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8,92 $\pm$ 0,67	7,97 $\pm$ 1,34	7,79 $\pm$ 0,57*	8,89 $\pm$ 0,55	8,55 $\pm$ 0,63
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	303,6 $\pm$ 80,1	248,4 $\pm$ 37,2	235,2 $\pm$ 90,7	290,6 $\pm$ 67,8	282,1 $\pm$ 55
Hb (g/dl)	13,54 $\pm$ 0,85	12,52 $\pm$ 1,29	12,12 $\pm$ 1,47*	13,80 $\pm$ 1,03	12,88 $\pm$ 1,27
VGM (fl)	54,00 $\pm$ 3,79	50,26 $\pm$ 4,46	49,53 $\pm$ 2,39*	50,49 $\pm$ 2,68	50,30 $\pm$ 3,20
CCMH (g/dl)	32,33 $\pm$ 2,90	33,03 $\pm$ 3,47	31,80 $\pm$ 2,65	32,17 $\pm$ 2,56	31,89 $\pm$ 3,22
HT (%)	51,21 $\pm$ 3,37	47,54 $\pm$ 5,69	39,66 $\pm$ 4,89***	45,02 $\pm$ 4,77**	42,11 $\pm$ 3,12***
methHb (%)	1,69 $\pm$ 0,82	1,75 $\pm$ 0,60	10,51 $\pm$ 1,50***	3,65 $\pm$ 1,11**	4,62 $\pm$ 1,02***

\* : Différence significative par rapport au témoin (P < 0,05).

\*\* : Différence hautement significative par rapport au témoin (P < 0,01).

\*\*\* : Différence très hautement significative par rapport au témoin (P < 0,001).





**Figure 19 :** Variation des paramètres hématologique chez les rats témoins et traités par le nitrate d’ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours « **A** : globules blancs ; **B** : lymphocytes ; **C** : monocytes ; **D** : globules rouges ; **E** : plaquettes ; **F** : volume globulaire moyen ; **G** : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine **H** : hémoglobine ; **I** : hématocrite ; **J** : méthémoglobine ».

### 5.3. Etude biochimique

Le gingembre comme un supplément alimentaire a entraîné une diminution significative ( $p < 0.05$ ) des concentrations sériques de l'acide urique et du cholestérol et une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) du taux des triglycérides chez le deuxième lot (0+G). Il n'y avait aucune différence significative dans les autres paramètres biochimiques par rapport au groupe témoin (tableau 12).

Le gavage oral des rats par le nitrate d'ammonium à raison de 400 mg/kg (N+0) a entraîné un trouble du métabolisme biochimique caractérisé par une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la glycémie, une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) de l'acide urique, de l'urée, la créatinine, la bilirubine totale et directe et une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) des lipides totaux, cholestérol, triglycéride, ASAT, ALAT, LDH, PAL par comparaison au groupe témoin.

L'addition du gingembre dans le régime alimentaire du troisième lot (N+G) a rétabli les paramètres dosés à leur valeur normale. Toutefois, on a noté une légère augmentation significative dans quelques paramètres par rapport au lot témoin.

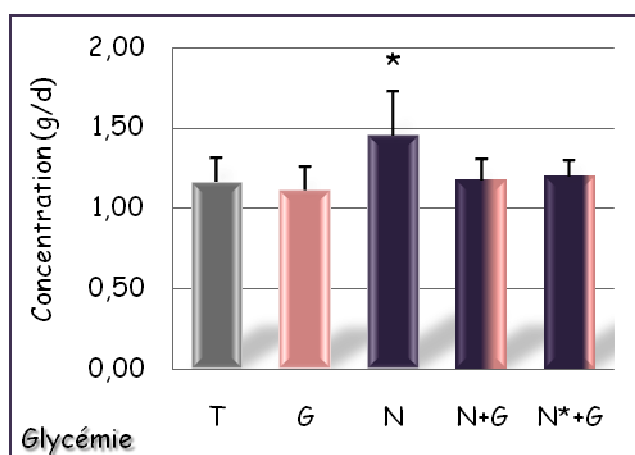
En revanche, nous enregistrons une modification très significative dans la concentration des paramètres biochimiques dosés chez le dernier groupe (N\*+G).

Les figures (20-23) résument l'ensemble des changements biochimiques provoqués par le nitrate d'ammonium et la combinaison avec le gingembre.

**Tableau 12 :** Variation des paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et / ou le gingembre pendant 30 jours.

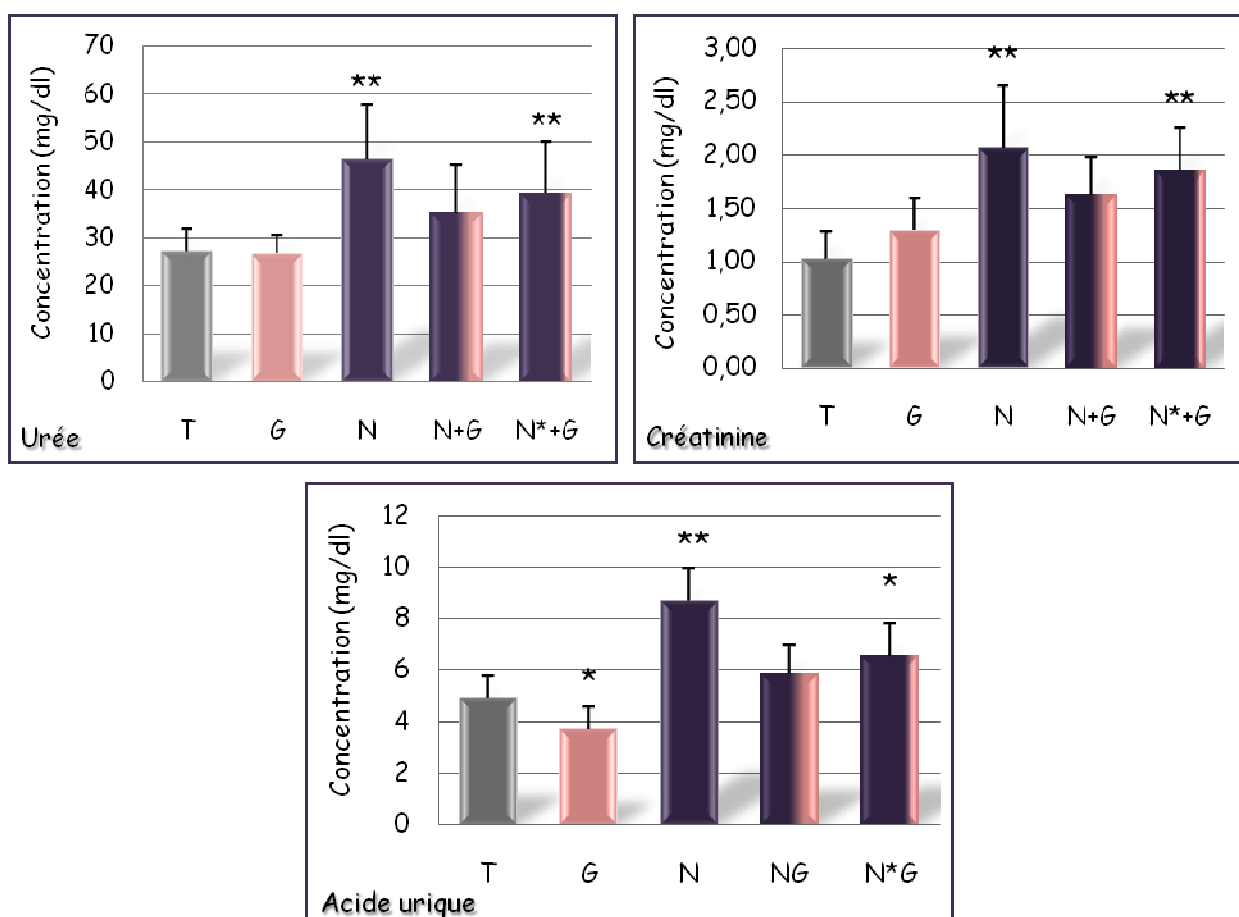
Paramètres	Lots expérimentaux				
	T (0 + 0)	G (0 + 2%)	N (400 mg/kg + 0)	N+G (400 mg/kg + 2%)	N*+G (600 mg/kg + 2%)
Glycémie (g/l)	1,15 ± 0,15	1,10 ± 0,14	1,45 ± 0,27 *	1,17 ± 0,13	1,19 ± 0,10
Acide urique (mg/dl)	4,90 ± 0,85	3,70 ± 0,87 *	6,80 ± 1,23 **	5,63 ± 1,07	6,36 ± 1,25 *
Urée (mg/dl)	27,08 ± 4,51	26,71 ± 3,69	46,41 ± 11,20 **	35,19 ± 9,94	39,28 ± 10,50 **
Créatinine (mg/dl)	1,02 ± 0,25	1,29 ± 0,29	2,06 ± 0,58 **	1,34 ± 0,35	1,67 ± 0,39 **
Cholestérol (mg/dl)	96,69 ± 14,40	76,86 ± 15,40 *	150,71 ± 27,20 ****	121,70 ± 25,40 *	130,56 ± 25,50 **
Triglycérides (mg/dl)	132,25 ± 22,20	87,83 ± 16,20 **	199,81 ± 33 ****	160,63 ± 24,90 *	169,36 ± 25,40 **
Lipides totaux (mg/dl)	326,95 ± 84,50	281,94 ± 80,50	720,85 ± 98,60 ****	426,79 ± 90,60 *	506,56 ± 92,80 **
Bilirubine T (mg/dl)	1,13 ± 0,28	0,92 ± 0,27	1,74 ± 0,31 **	1,25 ± 0,30	1,44 ± 0,31 *
Bilirubine D (mg/dl)	0,56 ± 0,20	0,61 ± 0,22	1,01 ± 0,24 **	0,76 ± 0,21	0,86 ± 0,22 ****
ASAT (UI/l)	30,07 ± 9,32	37,26 ± 9,55	60,50 ± 10,30 ****	42,33 ± 9,82 *	46,39 ± 10,10 **
ALAT (UI/l)	26,43 ± 6,45	32,89 ± 6,54	45,47 ± 8,20 ****	35,58 ± 6,09 *	41,05 ± 7,38 **
PAL (UI/l)	130,90 ± 14,60	145,25 ± 13,20	243,83 ± 23,70 ****	159,63 ± 20,60 *	169,75 ± 20,90 **
LDH (UI/l)	165,08 ± 32,80	177,93 ± 31,90	296,18 ± 36,20 ****	229,60 ± 34,50 **	274,76 ± 35,40 ****

\* (P < 0.05) ; \*\* (P < 0.01) ; \*\*\* (P < 0.001) : Différence significative par rapport aux témoins.



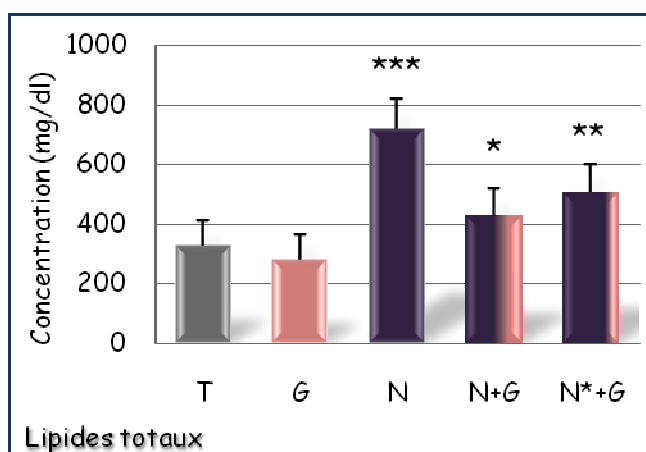
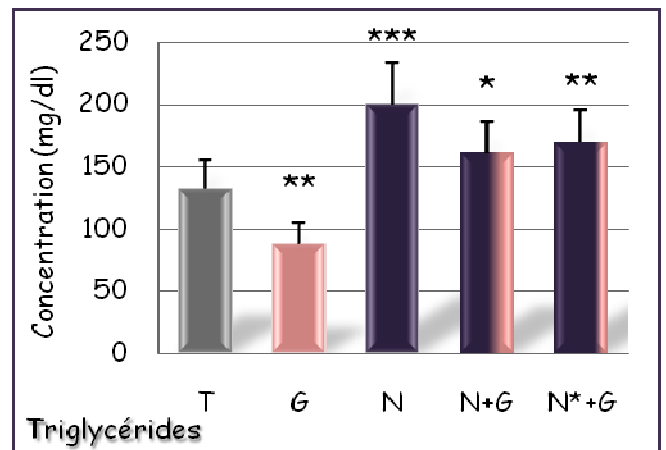
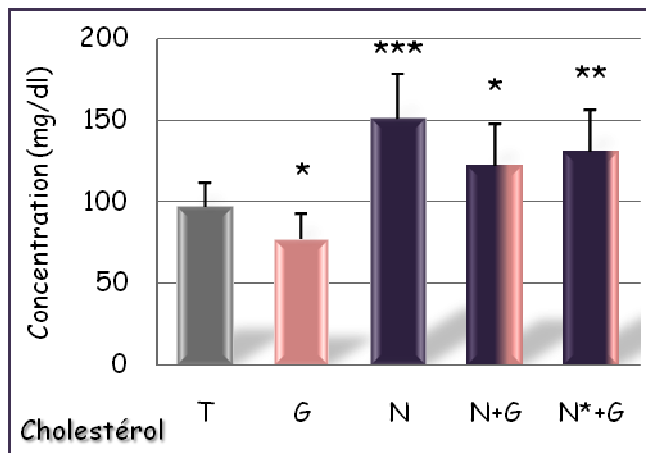
**Figure 20 :** Variation de la glycémie chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et /ou le gingembre pendant 30 jours.

**Bilan rénal sanguin**



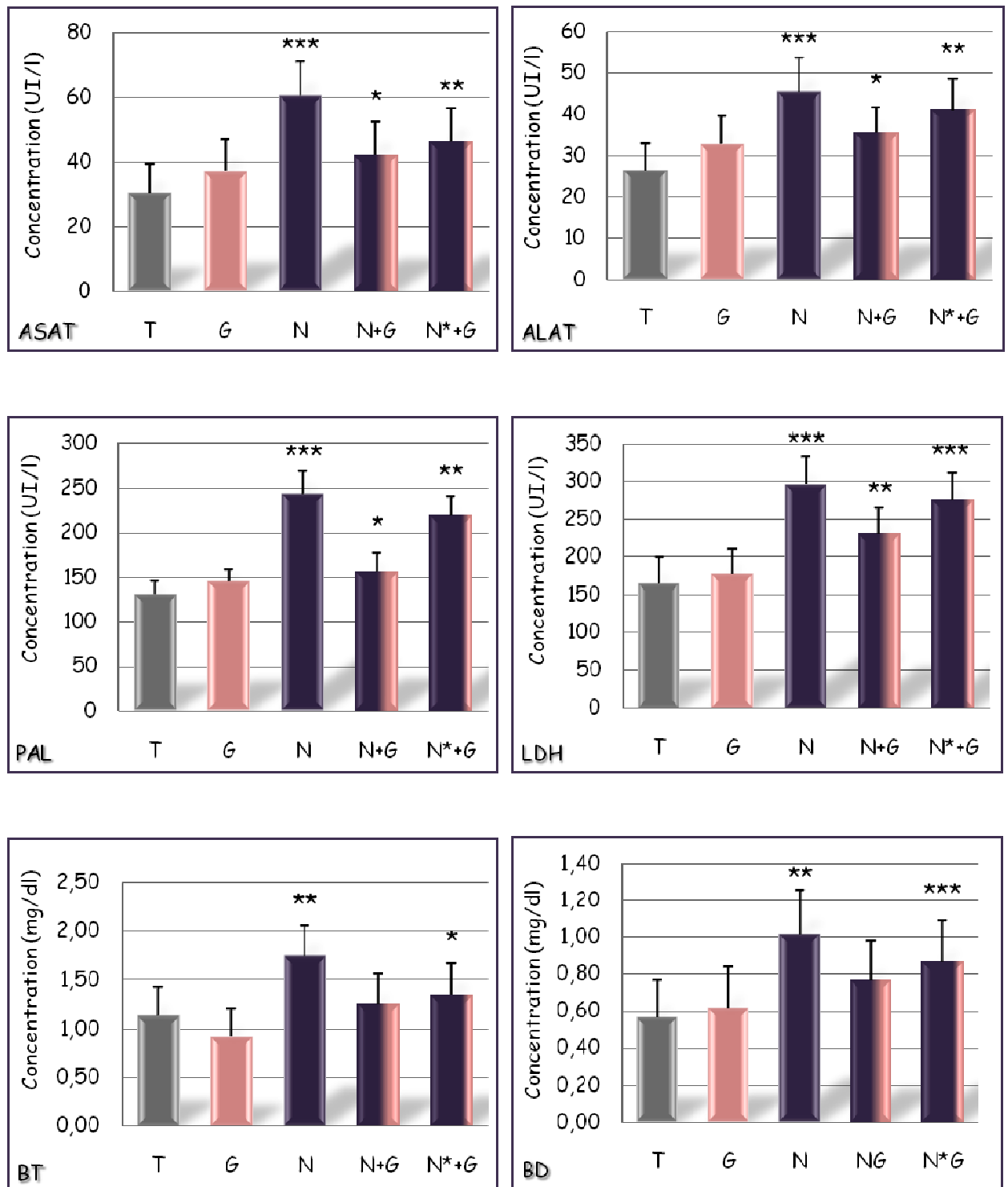
**Figure 21 :** Variation du bilan rénal « urée, créatinine & acide urique » chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.

## Bilan lipidique



**Figure 22 :** Variation du bilan lipidique « lipides totaux, triglycérides & cholestérol » chez les rats témoins et traités par les nitrates d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.

**Bilan hépatique**



**Figure 23 :** Variation du bilan hépatique « ASAT, ALAT, PAL, LDH, BT & BD » chez les rats témoins et traités par les nitrates d’ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.

## 5.4. Influence du traitement sur la variation de paramètres du stress oxydant

### 5.4.1. Le malondialdéhyde (MDA)

Les résultats obtenus (tableau 13, figure 24) montrent une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,01$ ) du taux de MDA dans le foie et les reins des rats mis sous nitrate d'ammonium (N+0) pendant 30 jours, tandis que le traitement par le gingembre seul (0+G) ou en combinaison avec l'ammonitrate (N+G) ne relèvent aucune différence significative par rapport au groupe témoin.

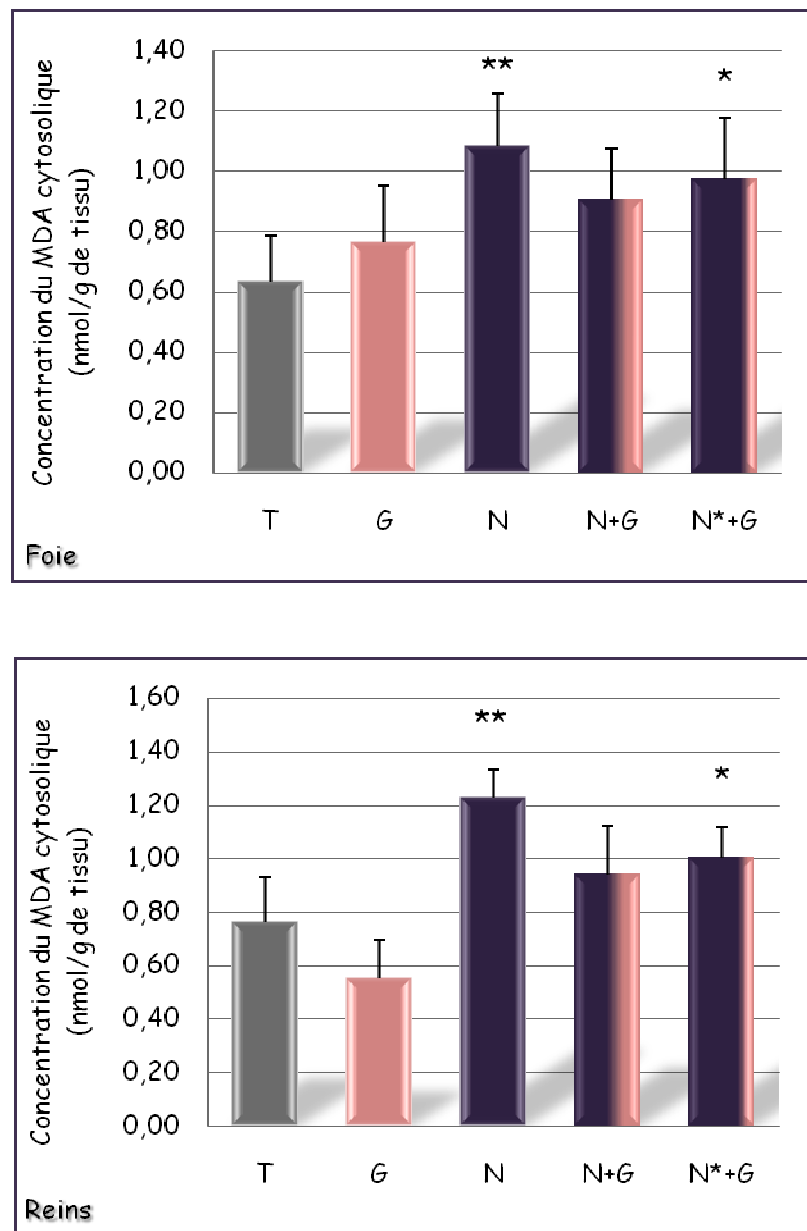
Une légère augmentation significative ( $p < 0.05$ ) dans le taux de MDA a été enregistrée dans le lot traité par la grande dose du polluant accompagné avec le gingembre (N\*+G) par rapport au lot témoin.

**Tableau 13** : Variation du taux de malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans le foie et les reins chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.

Lots expérimentaux	Organes	
	Foie	Reins
T (0 + 0)	0,63 ± 0,15	0,76 ± 0,16
G (0 + 2 %)	0,76 ± 0,18	0,54 ± 0,14
N (400 mg/kg + 0)	1,08 ± 0,17 **	1,22 ± 0,10 **
N+G (400 mg/kg + 2 %)	0,90 ± 0,16	0,94 ± 0,18
N*+G (600 mg/kg + 2%)	0,97 ± 0,20 *	1,00 ± 0,11 *

\* : Différence significative par rapport au témoin ( $p < 0.05$ ).

\*\* : Différence hautement significative par rapport au témoin ( $p < 0.01$ ).



**Figure 24 :** Variation du taux de MDA dans le foie et les reins des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et le gingembre pendant 30 jours

#### 5.4.2. Le glutathion tissulaire (GSH)

Le gavage des rats par le nitrate d'ammonium (N+0) à une dose de 400 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours a entraîné un effondrement de glutathion tissulaire. On note une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) du glutathion dans le foie, les reins, les intestins et une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) dans la rate, ainsi qu'une diminution significative ( $p < 0.05$ ) dans les testicules et le cœur.

En revanche, chez les rats traités par la combinaison du nitrate d'ammonium et la poudre de gingembre (N+G) on signale une diminution significative du glutathion hépatique et intestinal, aucun autre changement significatif n'a été enregistré dans les autres organes en comparaison avec le groupe témoin.

Chez le dernier lot (N\*+G), une diminution hautement significative du taux de GSH a été signalée dans le foie, les reins et les intestins en comparaison avec le groupe témoin (tableau 14 et figure 25).

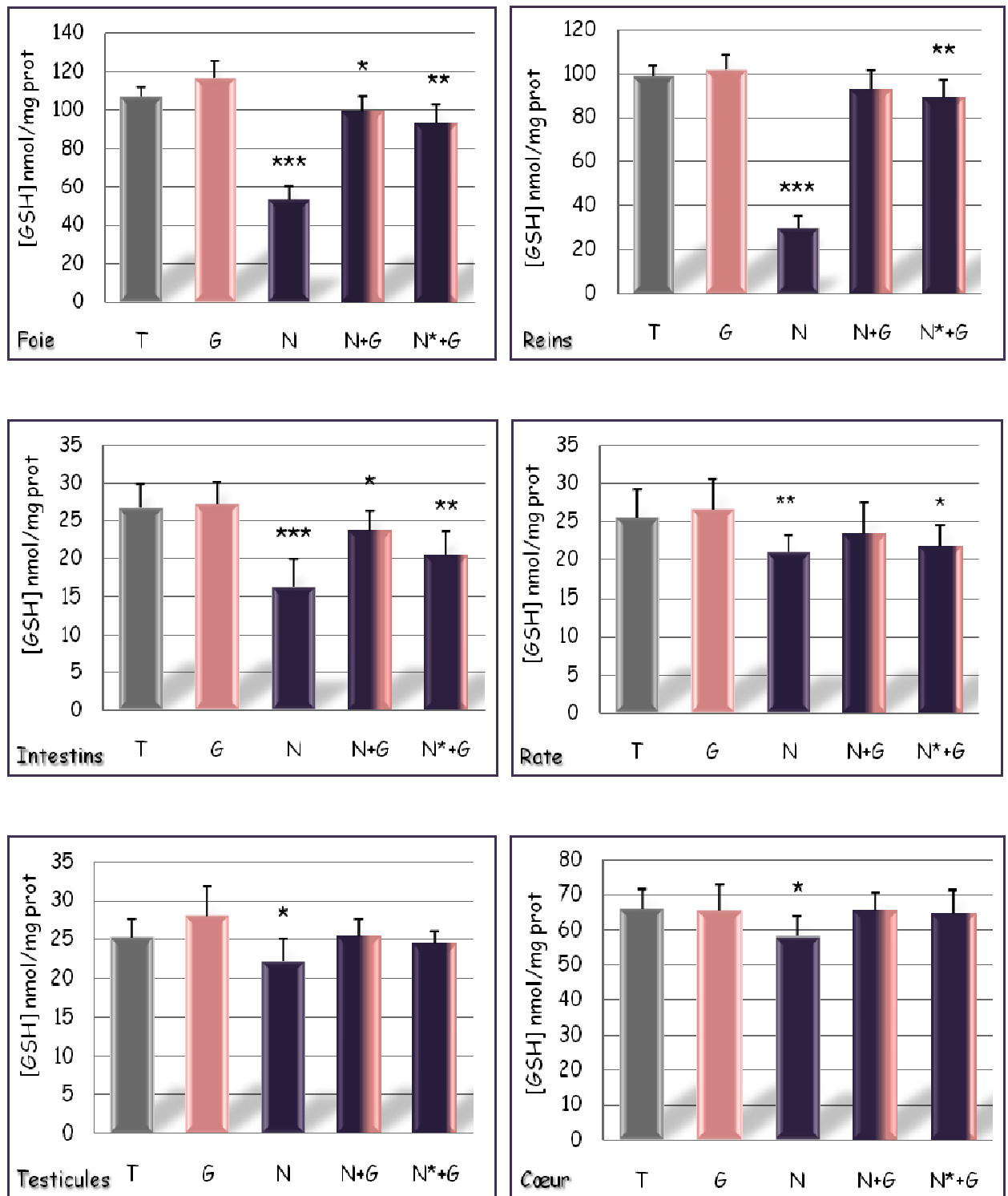
**Tableau 14 :** Variation du taux de glutathion (n mol/ mg protéines) chez les rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et / ou le gingembre pendant 30 jours.

Organes	Lots expérimentaux				
	T (0 + 0)	G (0 + 2%)	N (400 mg/kg + 0)	N+G (400 mg/kg + 2%)	N++G (600 mg/kg + 2%)
Foie	106,90 ± 4,66	113,60 ± 8,51	52,90 ± 6,89***	99,27 ± 7,31*	93,07 ± 9,27**
Reins	98,69 ± 4,68	101,66 ± 6,61	29,51 ± 5,49***	92,73 ± 8,28	88,89 ± 7,96**
Intestins	26,67 ± 3,1	27,21 ± 2,81	16,21 ± 3,63***	23,64 ± 2,55*	20,42 ± 3,11**
Testicules	25,22 ± 2,39	28 ± 3,8	22,16 ± 2,82*	25,4 ± 2,22	24,42 ± 1,59
Rate	25,46 ± 3,67	26,59 ± 3,93	20,94 ± 2,07**	23,33 ± 4,01	21,72 ± 2,66*
Cœur	66,02 ± 5,54	65,33 ± 7,3	58,09 ± 5,56*	65,35 ± 5,15	64,57 ± 6,58

\* : Différence significatif par rapport au témoin (P < 0.05).

\*\* : Différence hautement significatif par rapport au témoin (P < 0.01).

\*\*\* : Différence très hautement significatif par rapport au témoin (P < 0.001).



**Figure 25 :** Variation du taux de glutathion hépatique, rénal, intestinal, splénique testiculaire et cardiaque chez les rats témoins et traités par le nitrate d’ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours.

### 5.4.3. L'activité enzymatique de la GPx, CAT & GST

Les résultats mentionnés au tableau 15 et les figures 26-28 permettent de montrer sur le plan hépatique une claire diminution hautement significative ( $p < 0,01$ ) des enzymes antioxydantes (GPx, CAT) et une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du GST chez les rats traités par 400 mg/kg d'ammonitrate (N+0). L'analyse de l'activité de ces enzymes au niveau des reins du même groupe révèle une légère diminution significative de l'activité enzymatique de la GPx, CAT et une augmentation significative du GST.

En revanche, la supplémentation du gingembre au régime alimentaire des rats (0+G) ne montre pas de différence significative avec le groupe témoin.

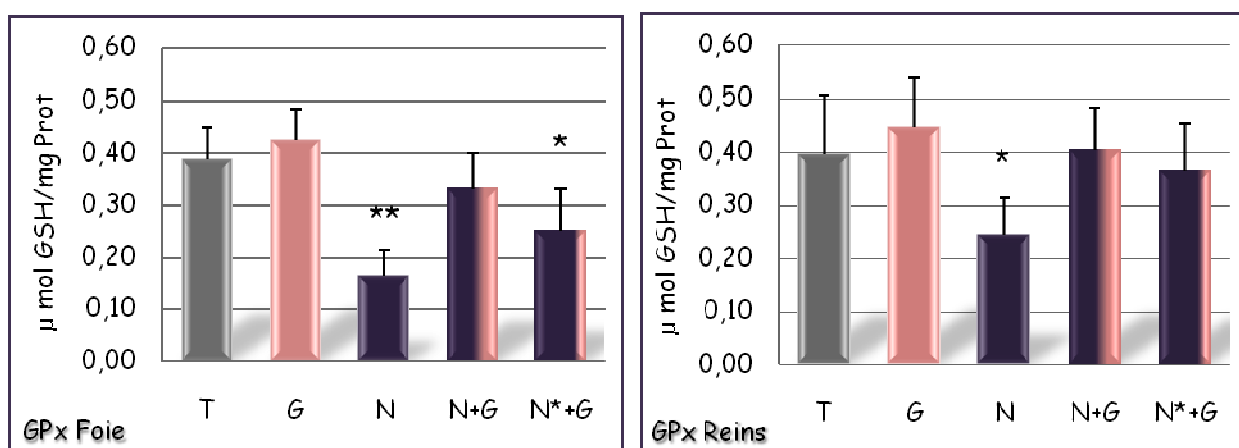
On observe également une restauration de l'activité des enzymes antioxydantes chez les groupe de combinaison (N+G) et (N\*+G).

**Tableau 15 :** Variation de l'activité enzymatique de la GPx ( $\mu\text{mol GSH}/\text{mg prot}$ ), GST ( $\mu\text{mol GST}/\text{min}/\text{mg prot}$ ) et la CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ ) dans le foie et les reins des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et ou le gingembre pendant 30 jours.

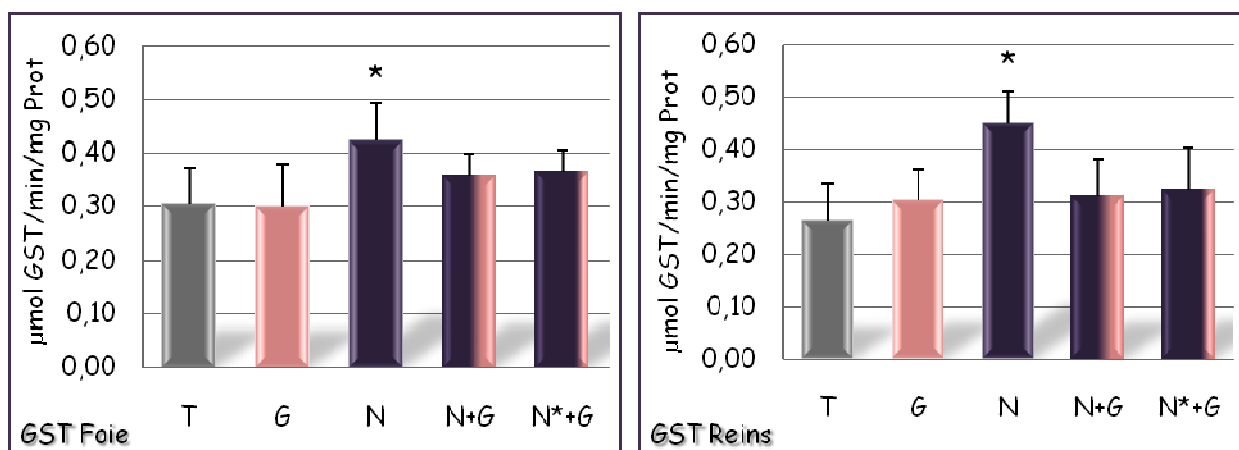
Lots expérimentaux	FOIE			REINS		
	GPx	GST	CAT	GPx	GST	CAT
T (0 + 0)	0,389 ± 0,06	0,304 ± 0,07	3,465 ± 0,51	0,397 ± 0,11	0,265 ± 0,07	1,604 ± 0,28
G (0 + 20%)	0,425 ± 0,06	0,300 ± 0,08	3,204 ± 0,59	0,448 ± 0,09	0,303 ± 0,06	1,788 ± 0,28
N (400 mg/kg + 0)	0,164 ± 0,05**	0,424 ± 0,07*	1,553 ± 0,60**	0,244 ± 0,07*	0,450 ± 0,06*	1,063 ± 0,26*
N+G (400 mg/kg + 20%)	0,331 ± 0,07	0,359 ± 0,04	2,785 ± 0,69	0,404 ± 0,08	0,311 ± 0,07	1,440 ± 0,27
N*+G (600 mg/kg + 20%)	0,251 ± 0,08*	0,366 ± 0,04	2,618 ± 0,65	0,364 ± 0,09	0,322 ± 0,08	1,356 ± 0,14

\* : Différence significative par rapport au témoin (P < 0.05).

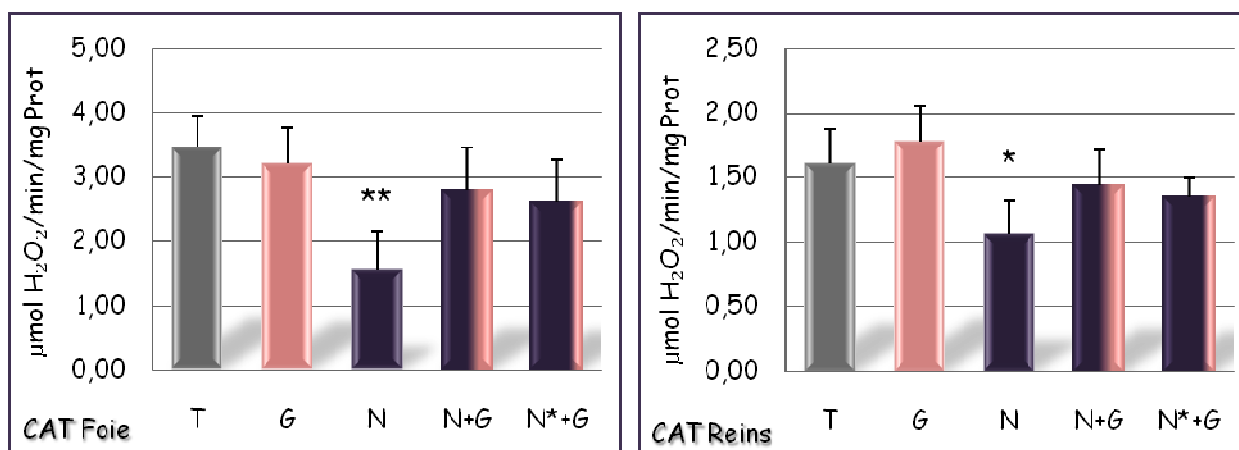
\*\* : Différence hautement significative par rapport au témoin (P < 0.01).



**Figure 26 :** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) ( $\mu$  mol GSH/mg de prot) dans le foie et les reins des rats témoins et traités.



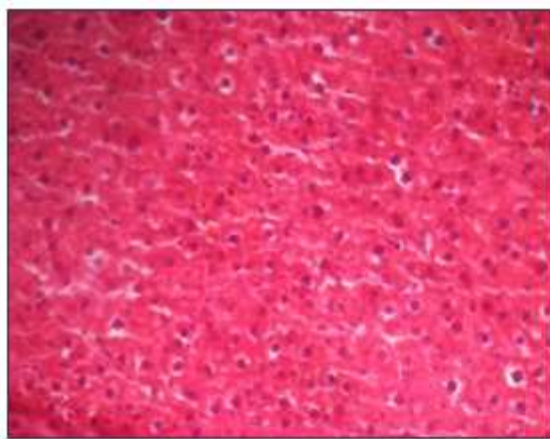
**Figure 27 :** Variation de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GSH-ST) ( $\mu$  mol GST/ min / mg de prot) dans le foie et les reins des rats témoins et traités.



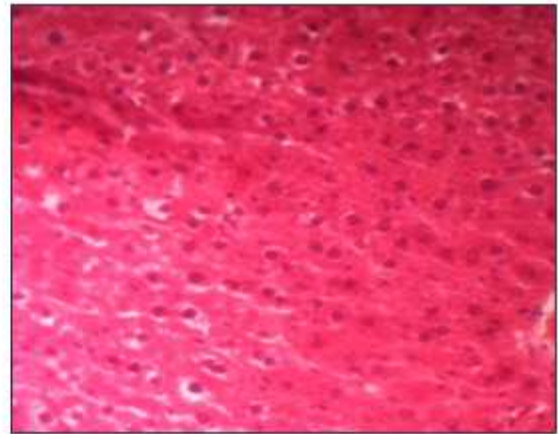
**Figure 28 :** Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) ( $\mu$  mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min / mg de prot) dans le foie et les reins des rats témoins et traités

### **5.5. Etude histologique**

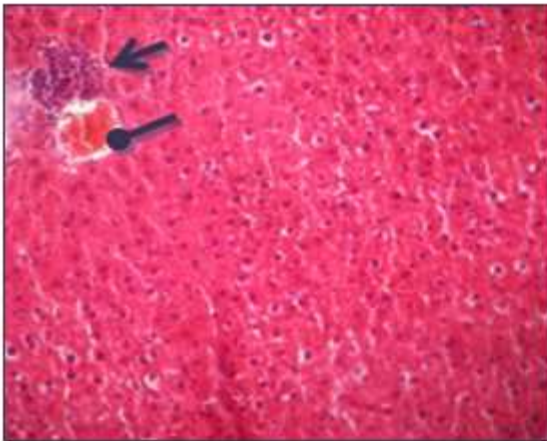
Le foie et le rein du rat mis sous le nitrate d'ammonium (400 mg/kg) pour une période de 30 jours (N+0), présentent respectivement des dégénérescences hépatocellulaires avec altération totale du parenchyme hépatique; et une atteinte tubulaire et vasculaire sévère accompagnée d'une dégénérescence des glomérules rénaux. Les coupes histologiques hépatiques et rénales des rats nourris par une combinaison de nitrate d'ammonium et le gingembre (N+G), montrent une apparence normale des hépatocytes. Les glomérules et les tubules rénaux semblent être régénérés en comparaison avec le groupe témoin.



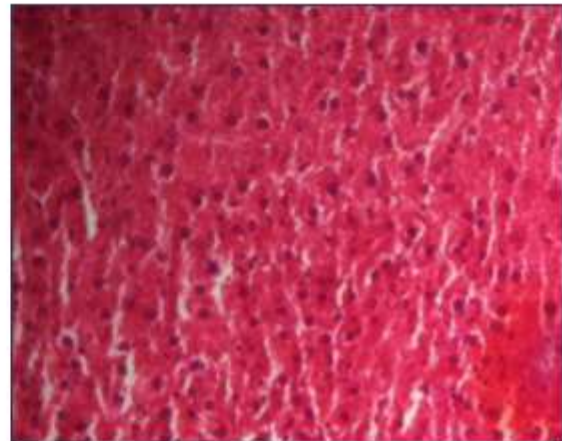
Groupe T (0+0)



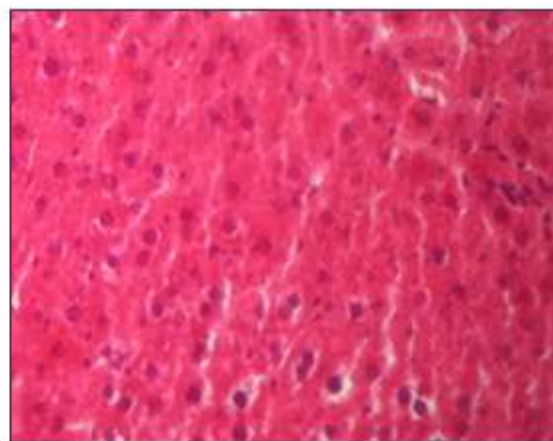
Groupe G (0+2%)



Groupe N (400mg/kg + 0)



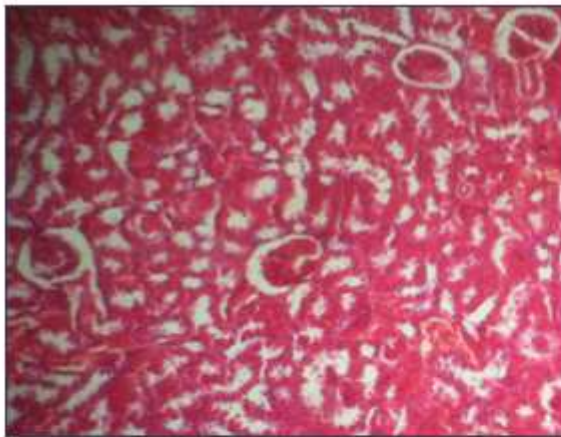
Groupe N+G (400 mg/kg + 2%)



Groupe N\*+G (600 mg/kg + 2%)

- Congestion cellulaire
- Vacuolisation des hépatocytes

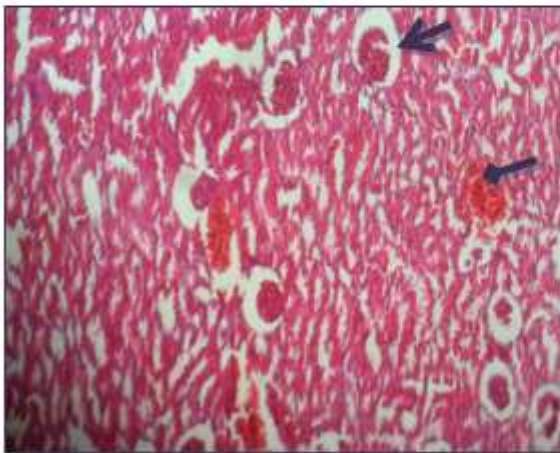
**Figure 29 :** Coupes histologiques du foie des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours « grandeur x 400 ».



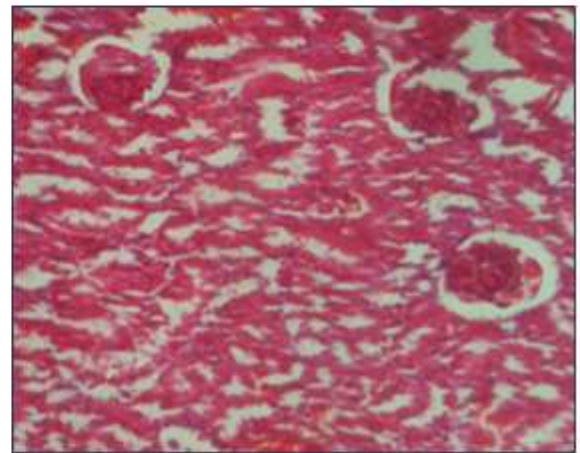
Groupe T (0+0)



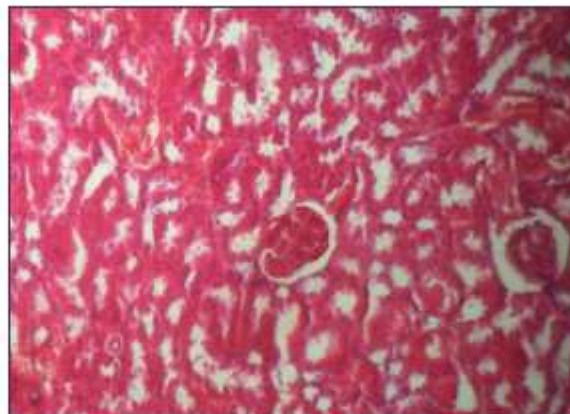
Groupe G (0+2%)



Groupe N (400mg/kg + 0)



Groupe N+G (400 mg/kg + 2%)



Groupe N\*+G (600 mg/kg + 2%)

- Hémorragie
- Grand espace de Bowman

**Figure 30 :** Coupes histologiques du rein des rats témoins et traités par le nitrate d'ammonium et/ou le gingembre pendant 30 jours « grandeur x 400 ».

*Sixième chapitre : Discussion*

## 6. Discussion

Un grand nombre de xénobiotiques ont été identifiés pour leurs potentiels à produire des radicaux libres dans les systèmes biologiques (Kehrer, 1993). Actuellement, on admet que les nitrates et les nitrites sont des précurseurs d'anion monoxyde d'azote ( $\text{NO}\bullet$ ) aboutissant à la production de peroxynitrite ( $\text{ONOO}$ ), et endommageant les molécules biologiques importantes comprenant des thiols, des lipides, des protéines, et des acides nucléiques (Raaf *et al*, 2009). Les effets toxicologiques des nitrates et des nitrites chez les vertébrés ont été évalués dans plusieurs espèces, y compris les humains (Fewtrell, 2004), les bétails (El Bahrie *et al*, 1997), les volailles (Atef *et al*, 1991), les poissons (Williams et Eddy, 1989) et les amphibiens (Marco *et al*, 1999).

De ce fait, limiter la production des radicaux libres présente un objectif thérapeutique de premier ordre. On a constaté dans notre étude que la supplémentation de 2 % de gingembre dans le régime alimentaire des rats pendant une période de 30 jours a rétabli à leurs valeurs normales tous les paramètres dosés.

L'effet le plus important du nitrate sur la lignée sanguine est son action hémolysante ( $p < 0,05$ ) induisant une microcytose. Noter aussi une diminution importante de l'hématocrite et une variation significative de l'hémoglobine due à sa transformation en méthémoglobine. La méthémoglobinémie est l'effet indésirable le plus souligné de l'intoxication aux dérivés nitrés. De nombreux travaux ont été entrepris sur ce sujet (Sadeq *et al*, 2008 ; Rodriguez-Estival *et al*, 2010). Nos résultats ont confirmé ces études, on a observé une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) du taux de méthHb dans les rats traités par 400 mg/kg de nitrate d'ammonium. En outre nous avons remarqué que le sang veineux recueilli dans des tubes secs avait une couleur rouge foncée restant intact après agitation manuelle de quelques secondes, concordant les résultats de (Henretig *et al*, 1988). Les nitrates ne sont pas directement méthémoglobinisants, mais dans l'appareil digestif, un pourcentage de nitrates est réduit en nitrites, qui sont dix fois plus cytotoxiques en raison de leurs propriétés oxydatives. Les nitrites passent dans la circulation sanguine, diffusant aux autres tissus. Ils entraînent une oxydation du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) présent dans l'hémoglobine en fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ce dérivé d'hémoglobine encore appelé méthémoglobine est incapable

de fixer l'oxygène, ce qui réduit son transport des poumons vers les tissus, générant des conditions d'hypoxie dans les tissus vivants (Reid, 2000 ; Umbreit, 2007). Au cours de ces réactions, les radicaux libres peuvent induire une peroxydation des acides gras insaturés des phospholipides membranaires. En conséquence, la fragilité osmotique de la membrane érythrocytaire responsable de l'hémolyse (Ozturk *et al*, 2003). Cependant, le gingembre est considéré comme efficace pour réduire le taux de méthémoglobine et restaurer les valeurs des paramètres hématologiques dans les lots de combinaisons, démontrant ses propriétés antioxydantes.

La racine de gingembre contient des composés polyphénoliques possédant la structure chimique idéale pour balayer les radicaux libres et protéger les lipides membranaires de la peroxydation. Les propriétés antioxydantes des polyphénols résultent de leur réactivité élevée comme donneurs d'hydrogène ou d'électrons et de leur capacité à stabiliser l'électron non apparié. De leur aptitude à séquestrer des métaux de transition empêchant par la suite la réaction de Fenton et la production de OH• (Rice-Evans *et al*, 1997).

La consommation d'une eau contaminée par le nitrate d'ammonium provoque un déséquilibre biochimique marqué essentiellement par une augmentation très significative du bilan hépatique et rénal accompagnée par une hyperglycémie et hyperlipidémie. Le nitrate peut également être suspect d'avoir un effet diabétogénique chez les enfants ; plusieurs études européennes ont essayé de déterminer une relation entre la concentration en nitrate des eaux potables et le diabète insulino-dépendant (DID). Les données sont toutefois limitées et contradictoires (Parslow *et al*, 1997; Moltchanova *et al*, 2004). Le rajout du gingembre dans la diète des rats a diminué la glycémie chez les rats de combinaisons, ces résultats sont en accord avec les études précédemment rapportées (Al-Amin *et al*, 2006 ; Shahidul Islam et Choi, 2008). Il est donc possible que la consommation de gingembre puisse avoir un effet bénéfique sur le contrôle du diabète, mais d'autres études sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Les résultats obtenus révèlent une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) des concentrations sériques du cholestérol, triglycérides et lipides totaux chez les rats

mis sous nitrate d'ammonium (N+0) ; cette hyperlipidémie peut être expliquée par l'hypothyroïdie (Jublanc et Bruckert, 2004 ; Pearce, 2004). Chez les animaux, des études expérimentales ont prouvé que le nitrate inorganique est un agent goitrigène à court terme provoquant une hypertrophie des cellules épithéliales de la glande thyroïdienne (Gatseva et Argirova, 2008). Toutefois, dans les lots de combinaisons nous avons enregistré une amélioration des taux de triglycéride, cholestérol et lipides totaux, ces résultats sont conformes aux travaux de (Bhandari *et al*, 2005 ; Alizadeh-Navaei *et al*, 2008). L'activité hypolipidémique du gingembre semble dépendre de sa capacité à :

- ✓ inhiber la biosynthèse cellulaire du cholestérol au niveau du foie, induisant une augmentation de l'activité des récepteurs LDL (Ness *et al*, 1996) ;
- ✓ inhiber l'hydrolyse des lipides dans le tractus gastro-intestinal (Han *et al*, 2005) réduisant la peroxydation lipidique (Liu *et al*, 2003) ;
- ✓ augmenter l'activité de la lipase et l'amylase pancréatique (Patel et Srinivavasan, 2000) ;
- ✓ augmenter le péristaltisme intestinal (Hashimoto *et al*, 2002) ;
- ✓ augmenter la conversion du cholestérol en acide biliaire et son excrétion fécale (Srinivasan et Sambaiah, 1991).

La créatinine, l'urée et l'acide urique, sont des déchets produits par le métabolisme protéique. Ils sont éliminés par les reins, et utilisés généralement comme indicateur d'une fonction rénale correcte. Lorsqu'une insuffisance rénale s'installe, les taux de ces paramètres augmentent, c'est ce que nous avons observé chez les rats du 3<sup>ème</sup> lot (N+0), prouvant l'effet néphrotoxique du nitrate d'ammonium (Boukerche *et al*, 2007). Nos résultats ont aussi démontré le rôle bénéfique du gingembre sur la fonction rénale. On a enregistré une normalisation du bilan rénal étudié (urée, créatinine et acide urique) après l'addition du gingembre comme supplément alimentaire. Ces résultats sont corrélés avec les travaux de (Ajith *et al*, 2007 ; Al-Qattan *et al*, 2008).

Concernant nos résultats sur les rapports hépato-corporels, on peut démontrer qu'une consommation importante de nitrate peut causer une hépatomégalie (N+0), pour évaluer cette lésion nous avons procédé à un bilan hépatique. Les activités d'ASAT,

ALAT, PAL et LDH ont été sensiblement élevées chez les rats traités au nitrate d'ammonium comparés au groupe témoin. Ainsi l'augmentation considérable du taux sérique de la bilirubine indique que la fonction excrétoire du foie est altérée. Confirmons l'effet hépatotoxique de ce xénobiotique. Nos résultats sont bien conformes aux données publiés précédemment par Ogur *et al* (2005), Boukerche *et al* (2007) et Rodriguez-Estival *et al* (2010). Nous avons également constaté un rétablissement du taux sérique de la bilirubine, et une amélioration des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT, PAL, LDH) après l'addition du gingembre au régime alimentaire des rats (N+G). Cette interprétation est renforcée par les résultats d'El-Sharaky *et al* (2009) et Rong *et al* (2009).

Pour défendre l'idée affirmant l'effet hépato-protecteur et néphroprotecteur exercé par le gingembre, des échantillons de foie et de rein des cinq groupes ont été examinés en microscopie optique. Le stress oxydant causé par le nitrate d'ammonium peut avoir un impact négatif sur ces tissus. Le foie et le rein du lot (N+0) présentent respectivement des dégénérescences hépatocellulaires avec altération total du parenchyme hépatique, une atteinte tubulaire et vasculaire sévère accompagnée d'une dégénérescence des glomérules rénaux. Ces résultats concordent avec ceux d'Ogur *et al*, 2005. Le gingembre améliore les modifications cellulaires observées précédemment, les coupes histologiques du lot (N+G) montrent une restitution des hépatocytes, et une régénération des glomérules et des tubules rénaux. Cet effet protecteur de gingembre est prouvé évidemment par des autres travaux (Shanmugam *et al*, 2010 ; Shanmugam *et al*, 2011).

Le stress oxydant est une circonstance anormale dans laquelle sont placés les tissus de notre organisme lorsqu'ils sont face à un flux accru de radicaux libres, et qu'ils n'arrivent plus à piéger ou à détruire. Evaluer le stress oxydant consiste donc à estimer les mécanismes de défense et analyser les produits secondaires qui peuvent en résulter. Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des plus importants marqueurs du stress oxydatif. Il a été mesuré dans le foie et les reins pour refléter le degré de la peroxydation lipidique. Impliquant principalement les acides gras polyinsaturés, ce processus

endommage la structure et la fonction cellulaire responsable de la perte de l'intégrité membranaire, et la lyse cellulaire (Romero *et al*, 1998 ; Stark, 2005). Dans notre étude, le gavage par le nitrates d'ammonium (N+0) a entraîné une augmentation significative du taux d'MDA dans le foie et le rein, expliquant que la peroxydation lipidique a eut lieu au niveau des tissus incriminés. (Ogur, 2005).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques (Halliwell, 1994). Parmi ces derniers, on retrouve principalement le glutathion réduit (GSH), il permet à l'organisme de se débarrasser des toxines et polluants indésirables, en formant avec eux un composé hydrosoluble susceptible d'être excrété dans l'urine ou la bile. Lorsque le glutathion est oxydé sous forme (GS•) il peut réagir avec un autre anion de glutathion pour former la molécule oxydée (GS-SG). Par la suite, elle peut être réduite en GSH de nouveau par la glutathion réductase NADPH-dépendante (Valko *et al*, 2007). Il est donc intéressant d'étudier le niveau de GSH dans le foie, les reins, les testicules, les intestins, la rate et le cœur. Lors du traitement avec le nitrate d'ammonium, les taux de GSH sont nettement diminués. Cet effondrement est peut être dû à sa conjugaison directe avec les espèces radicalaires produites par ce xénobiotique et/ou en raison de l'inhibition des enzymes antioxydantes qui sont impliquées dans sa régénération. Nos résultats conviennent avec ceux de Boukerche *et al*, 2007.

Le glutathion (GSH) exerce son rôle en synergie avec les enzymes antioxydantes, parmi lesquelles figurent la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px), la glutathion réductase (GSH-R), la glutathion transférase (GSH-ST), la catalase (CAT) et le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase. Dans cette étude, nous allons doser la GSH-Px, la CAT et la GSH-ST dans le foie et les reins comme étant des organes cibles spécialisés dans la détoxification. La catalase est une enzyme ayant un rôle majeur de catalysant d'où son nom, la décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Cette fonction est partagée avec la glutathion peroxydase qui a besoin de glutathion et de sélénium pour fonctionner correctement, en plus son rôle principal d'éliminer les peroxydes lipidiques

(Valko *et al*, 2007). La glutathion S-transférase est une enzyme ayant un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et la protection contre les métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules (Hayes et Pulford, 1995).

L'évaluation biochimique de ces systèmes enzymatiques antioxydants a mis en évidence une réduction significative de l'activité de la GSH-Px et la CAT suivie par une augmentation significative de l'activité de la GSH-ST dans le foie et le rein des rats soumis au nitrate d'ammonium (N+0). Les niveaux de ces antioxydants peuvent fournir une idée claire sur l'ampleur des dégâts cytotoxiques qui se produisent dans ces tissus (Sies, 1993). La réduction du niveau de CAT est peut être due à la production excessive d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, la diminution de l'activité de la GSH-Px est due à la déplétion de GSH intracellulaire. La capacité d'ONOO<sup>-</sup> à traverser les membranes cellulaires contribue à sa toxicité, en permettant de cibler les molécules cellulaires (Macfadyen *et al*, 1999). Le peroxy-nitrite a été démontrée dans l'inhibition de l'activité de la CAT (Keng *et al*, 2000), la GSH-Px (Padmaja *et al*, 1998), de favoriser la formation des peroxydes lipidiques (Shi *et al*, 1999), nitration du cytochrome C (Cassina *et al*, 2000) et la modification de GSH-R (Francescutti *et al*, 1996). La persistance de cette inhibition, la production de ROS et l'augmentation de NO• aboutissent à un effondrement des systèmes antioxydants (Chow et Hong, 2002). Dans de telles circonstances, ces systèmes peuvent devenir incapables de protéger l'organisme contre les attaques radicalaires, c'est pourquoi la recherche d'antioxydants naturels ou d'extraits à pouvoir antioxydant a suscité beaucoup d'intérêt.

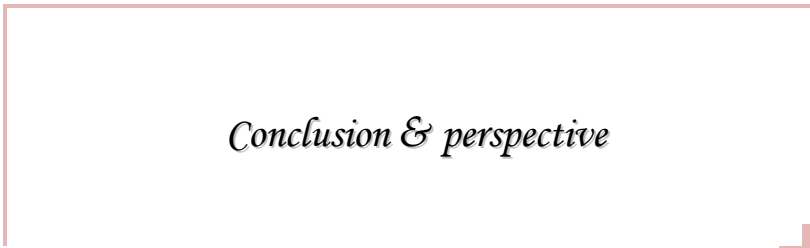
La supplémentation du gingembre réduit considérablement le stress oxydatif au niveau des tissus prélevés en stimulant l'activité de la CAT et GSH-Px, en restituant les teneurs en GSH et en rétablissant les niveaux d'MDA à la norme en comparaison avec le groupe témoin. Cela serait probablement dû à l'influence des composés bioactifs présents dans la plante (El-Sharaky *et al*, 2009). Nos observations corroborent celles d'autres chercheurs ; et parmi ces études on peut citer les recherches de Mallikarjuna *et al* (2008) qui ont constaté que 1 % de gingembre améliore considérablement les effets délétères causés par l'éthanol. En outre Sharma et Singh (2012) ont montré que le jus de

gingembre augmente les niveaux de GSH, SOD, CAT, GPx, GR et diminue la peroxydation lipidique provoquée par le dichlorvos seul ou en combinaison avec le lindane chez les rats.

Le gingembre a été prouvé d'avoir d'excellentes propriétés antioxydantes jusqu'à 40 fois plus élevées que la vitamine E (Shin *et al*, 2005 ; Shanmugam *et al*, 2010 ; Onwuka *et al*, 2011 ; Ramudu *et al*, 2011 ; Charles, 2013). Cette activité est positivement associée au contenu en phénols. Les principaux composés phénoliques sont les gingerols, les shogaols, les paradols et le zingéron (Dugasani *et al*. 2010). Le gingembre semble exercer son action antioxydante en assurant le balayage de l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyles (Adhikari *et al*, 2007 ; Ali *et al*, 2008). En diminuant la production de NO• cytotoxique (Ippoushi *et al*, 2003 ; Ippoushi *et al*, 2005 ; Shimodo *et al*, 2010) et en réduisant les risques de pathologies liées au stress oxydant.

À la suite d'une trentaine d'analyses effectuées, le gingembre, ainsi que le curcuma, la menthe, la coriandre, le brocoli et les choux de Bruxelles sont classés parmi les quatorze végétaux frais les plus fortement antioxydants (Kaur et Kapoor, 2002).

Étant donné que la quantité de gingembre étudiée peut être facilement incorporée et consommée par les humains, un apport régulier de gingembre peut être suggéré pour renforcer le statut antioxydant, qui à son tour permettra de réduire les dommages oxydatifs dans les tissus vivants.

A decorative red L-shaped line consisting of a horizontal top bar and a vertical left bar, with a small red corner bracket at the bottom right.

*Conclusion & perspective*

## **Conclusion & Perspective**

Notre projet d'étude vise à évaluer d'une part le potentiel toxique d'un contaminant à usage agricole, le nitrate d'ammonium et d'autre part montrer les effets bénéfiques du gingembre «*Zingiber officinale*». Pour mener à terme notre projet de recherche des paramètres hématologiques, biochimiques et certains marqueurs de stress oxydant ont été mesurés chez des rats témoins et traités par nitrate d'ammonium et/ou gingembre pour une période de 30 jours. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants :

- ❖ Une croissance normale des rats, aucun changement significatif n'a été enregistré durant la période de traitement.
- ❖ Les rats mis sous 400 mg/kg de nitrate d'ammonium montrent une augmentation de la méthémoglobine et une diminution significative des paramètres hématologiques (GR, GB, Hb, VGM, HT). En revanche, le rajout du gingembre dans la diète des rats a rétabli les paramètres étudiés par rapport au groupe témoin.
- ❖ Sur le plan biochimique, la toxicité du nitrate d'ammonium s'est manifestée par un déséquilibre métabolique essentiellement marqué par une hyperglycémie, hyperlipidémie, une augmentation très significative du bilan hépatique et rénal. Cependant, la présence du gingembre dans le régime alimentaire a restauré les paramètres biologiques à leur valeur normale, par rapport au lot témoin.
- ❖ Les rats soumis au nitrate d'ammonium développent une augmentation du taux tissulaire de MDA et de la GSH-ST, diminution de l'activité enzymatique de la GSH-Px et la CAT avec un effondrement du taux de glutathion. Ces paramètres ont été équilibrés par la supplémentation du gingembre.
- ❖ Les coupes histologiques réalisées sur des fragments de foie et de rein, permettent de confirmer l'effet cytoprotecteur du gingembre par la restitution des hépatocytes, la régénération des glomérules et des tubules rénaux.

Malgré l'intoxication au nitrate d'ammonium, aucune perte d'animaux n'a été enregistrée, mais plusieurs paramètres biochimiques et hématologiques étaient affectés, en particulier les marqueurs du stress oxydant. Ce dernier est un syndrome qu'il

convient de mettre en évidence vue son implication dans plusieurs pathologies. Les antioxydants naturels sont considérés comme une thérapie idéale pour faire face au stress oxydant. Le gingembre est l'une des épices communément consommée pour ses propriétés culinaires et médicinales. Plusieurs études se sont intéressées à sa racine fraîche ou sèche, mettant en évidence la présence non seulement de composés actifs capables de piéger les radicaux libres et d'inhiber les processus d'oxydation, mais aussi sa richesse en éléments minéraux indispensables pour certaines enzymes antioxydantes.

Notre étude s'est limitée à l'utilisation de la racine dans sa globalité. L'extraction des principes actifs n'a pas été abordée dans ce projet mais nos résultats probants nous permettent d'affirmer les effets bénéfiques de cette plante médicinale.

Pour conclure, l'effet des plantes médicinales peut être bénéfique pour l'organisme si une utilisation rationnelle est préconisée. Un apport adéquat de gingembre dans notre régime alimentaire serait avantageux sur notre santé.

Comme, perspective, il serait intéressant de compléter nos résultats par le dosage des autres paramètres tels que le radical monoxyde d'azote, la SOD, la GR, le rapport GSH/GSSG...)

On espère dans le prochain travail :

- ✓ Extraire les substances actives responsables des propriétés antioxydantes.
- ✓ Etudier d'autres plantes médicinales plantées en Algérie et comparer leurs propriétés phytothérapeutiques avec celle de gingembre.

---

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

---

**Abraham P.** Oxidative stress in paracetamol-induced pathogenesis : (I) Renal damage. *Indian J. Biochem. Biophys.* 2005 ; 42 : 59-62.

**Adhikari S, Priyadarsini K, Mukherjee T.** Physico-chemical studies on the evaluation of the antioxidant activity of herbal extracts and active principles of some indian medicinal plants. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2007 ; 40(3) : 174-183.

**Aebi H.** Catalase in Vitro. *Method. Enzym.* 1984 ; 105 : 121-126.

**Ajith TA, Nivitha V, Usha S.** Zingiber officinales Roscoe alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatin induced acute renal failure. *Food Chem. Toxicol.* 2007 ; 45(6) : 921-927.

**Al-Amin ZM, Thomson M, Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R, Ali M.** Anti-diabetic and hypolipidemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Br. J. Nutr.* 2006 ; 96 : 660-666.

**Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A.** Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. *Food Chem. Toxicol.* 2008 ; 46 : 409-420.

**Alizadeh-Navaei R, Roozbeh F, Saravi M, Pouramir M, Jalali F, Moghadamnia AA.** Investigation of the effect of ginger on the lipid levels. *Saudi Med. J.* 2008 ; 29 (9) : 1280-1284.

**Al-Qattan K, Thomson M, Ali M.** Garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) attenuate structural nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Clin. Nutr. Metab.* 2008 ; 3 : 62-71.

**Altman RD, Marcussen KC.** Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2001 ; 44 : 2461-2462.

**Asmus KD, Bonifacic M.** *Free radical chemistry.* (3-54). In : Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (Sen CK, Packer L, Hanninen O. Ed). Elsevier : Amsterdam, 2000.

**Atef M, Abo-Norage MAM, Hanafy MSM, Agag AE.** Pharmaco-toxicological aspects of nitrate and nitrite in domestic fowls. *Br. Poult. Sci.* 1991 ; 32 : 399-404.

**Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W.** The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002 ; 397 : 342-344.

**Bai L, Sun GY.** Strong carcinogen-N-nitroso compounds. *Agric. Technol.* 2002 ; 22 : 98-101.

**Barholomew B, Hill MJ.** The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food chem. Toxicol.* 1984 ; 22 : 789-795.

**Barrett JH, Parslow RC, McKinney PA, Law GR, Forman D.** Nitrate in drinking water and the incidence of gastric, esophageal, and brain cancer in Yorkshire, England. *Cancer Causes Control.* 1998 ; 9 : 153-159.

**Bartosz G.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments Toxicol.* 2003 ; 9 : 5-21.

**Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990 ; 87 : 1620-1624.

**Berlette BS, Stadtman ER.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 : 20313-20316.

**Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE.** Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem. J.* 1995 ; 311: 425-430.

**Bhandari U, Kanojia R, Pillai KK.** Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on dyslipidaemia in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2005 ; 97 : 227-230.

**Bock E, Wagner M.** Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. *Procarvates* 2006 ; 2 : 457-495.

**Bode AM, Dong Z.** The amazing and mighty ginger. In: Herbal medicine «biomolecular and clinical aspects». (Benzie IFF, Wachtel-Galor S. Eds). 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press Taylor & Francis Group : New York, 2011.

**Boukerche S, Aouacheri W, Saka S.** The toxic effects of nitrates: biological study in humans and animals. *Ann. Biol. Clin.* 2007 ; 65(4) : 385-391.

**Boullard B.** *Plantes médicinales du monde : croyances et réalités.* Editions Estem : Paris, 2001.

**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 ; 72 : 248-254.

**Bruneton J.** *Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales.* 3<sup>ème</sup> édition. Tec & Doc Lavoisier : Paris, 1999.

**Bruneton J.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* 4<sup>ème</sup> ed. Tec & Doc Lavoisier : Paris, 2009.

**Bryan NS.** Nitrite in nitric oxide biology : Cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic. Biol. Med.* 2006 ; 41: 691-701.

**Buccolo G, David H.** Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem.* 1973 ; 19 (5) : 476-482.

**Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S.** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 2002 ; 383(6) : 933-943.

**Camargo JA, Alonso A, Salamanca A.** Nitrate toxicity to aquatic animals : a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 2005 ; 58 : 1255-1267.

**Cash T, Pan Y, Simon MC.** Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biol. Med.* 2007 ; 43 : 1219-1225.

**Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, Freeman BA, Radi R.** Cytochrome C nitration by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275 : 21409-21415.

**Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L, Casteilla L.** Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Méd. Sci.* 2006 ; 22 : 47-53.

**Chaiyakunapruk N, Kitikannakorn N, Nathisuwan S, Leeprabobboon K, Leelasettagool C.** The efficacy of ginger for the prevention of postoperative nausea and vomiting : a meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006 ; 194 : 95-99.

**Charles DJ.** *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources.* Springer science : New york, 2013.

**Chow CK, Hong CB.** Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicol.* 2002 ; 180 : 195-207.

**Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD.** Zingiberis rhizoma : a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomed.* 2005 ; 12 : 684-701.

**Coss A, Cantor KP, Reif JS, Lynch CF, Ward MH.** Pancreatic cancer and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite. *Am. J. Epidemiol.* 2004 ; 159 : 693-701.

**Cotelle N.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001 ; 1 : 569-590.

**Cottet MJ, et al.** Dosage des lipides sériques par la méthode sulfo-phospho-vanillique (1) de E Chabrol et R. Charonnat. Académie National de Médecine. 1965; 149 : 331-338.

**Csala M, Szarka A, Margittai E, Mile V, Kardon T, Braun L, Mandl J, Bánhegyi G.** Role of vitamin E in ascorbate-dependent protein thiol oxidation in rat liver endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001 ; 388 : 55-59.

**Darmaun D, Smith SD, Sweeten S, Sager BK, Welch S, Mauras N.** Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes* 2005 ; 54 : 190-196.

**Davies KJ.** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000 ; 50 : 279-289.

**Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ.** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 1997; 324 : 1-18.

**De Coursey TE.** Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiol.* 2010 ; 25(1) : 27-40.

**Deisseroth A, Dounce AL.** Catalase : Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 1970 ; 50 : 319-375.

**Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D.** Radicaux libres et stress oxydant. *Aspects biologiques et pathologiques.* TEC & DOC - Lavoisier éditions médicales internationales : Paris, 2005.

**De Roos AJ, Ward MH, Lynch CF, Cantor KP.** Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancers. *Epidemiol.* 2003 ; 14 : 640-649.

**Du ST, Zhang YS, Lin XY.** Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Agric. Sci. China* 2007 ; 6(10) : 1246-1255.

**Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN.** Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol* 2010 ; 127(2) : 515-520.

**Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith L, Golden M, Benjamin N.** Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat. Med.* 1995 ; 1 : 546- 551.

**El Bahri L, Belguith J, Blouin A.** Toxicology of nitrates and nitrites in livestock. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 1997 ; 19 (5) : 643-648.

**Ellen G, Schuller PL.** Nitrate, origin of continuous anxiety. (97-134). In : Nitrosamine Problem. Preusmann R. (ed.) Das. Deutsche Forschungs Verlag Chemie GmbH: Weinheim, 1983.

**El-Sharaky AS, Newairy AA, Kamel MA, Eweda SM.** Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009 ; 47 : 1584-1590.

**Ensiyeh J, Sakineh MA.** Comparing ginger and vitamin B6 for the treatment of nausea and vomiting in pregnancy : a randomised controlled trial. *Midwifery* 2009 ; 25(6) : 649-653.

**Epp O, Ladenstein R, Wendel A.** The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2nm resolution. *Eur. J. Biochem.* 1983 ; 133 : 51-69.

**Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G.** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 1992 ; 13 : 341-390.

**Evelyne KA, Malloy HT.** Microdetermination of oxyhemoglobin methemoglobine and sulfhemoglobine in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 1938 ; 126 : 655-662.

**Faivre Cl, Lejeune R, Staub H, Goetz P.** Monographie médicalisée, Zingiber officinale Roscoe. *Phytothérapie* 2006 ; 2 : 99-102.

**Fang YZ, Yang S, Wu G.** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002 ; 18 : 872-879.

**Favier A.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'actualité Chimique* 2003 : 108-115.

**Favier A.** Oxidative stress in human disease. *Ann. Pharm. Fr.* 2006 ; 64(6) : 390-396.

**Fawcett JK, Scott JE.** A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 1960 ; 13 : 156-159.

**Fewtrell L.** Drinking-water nitrate, methemoglobinemia and global burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect.* 2004 ; 112 (14) : 1371-1374.

**Ficker CE, Arnason JT, Vindas PS, Alvarez LP, Akpagana K, Gbéassor M, De Souza C, Smith ML.** Inhibition of human pathogenic fungi by ethnobotanically selected plant extracts. *Mycoses* 2003 ; 46 : 29-37.

**Flohe L, Gunzler WA.** Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 1984 ; 105 : 114-121.

**Flora SJS, Mittal M, Mehta A.** Heavy metal induced oxidative stress & it's possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 2008 ; 128 : 501-523.

**Francescutti D, Baldwin J, Lee L, Mutus B.** Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. *Protein Eng.* 1996 ; 9 : 189-194.

**Garthwaite J.** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991 ; 14 : 60-67.

**Gatseva PD, Argirova MD.** High-nitrate levels in drinking water may be a risk factor for thyroid dysfunction in children and pregnant women living in rural Bulgarian areas. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2008 ; 211 : 555-559.

**Geurts R, Bisseling T.** Rhizobium Nod factor perception and signalling. *Plant Cell.* 2002 ; 14 : 239-249.

**Ghayar MN, Gilani AH.** Ginger lowers blood pressure through blockade of voltage-dependent calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005 ; 45 : 74-80.

**Ghayar MN, Khan AH, Gilani AH.** Ginger facilitates cholinergic activity possible due to blockade of muscarinic autoreceptors in rat stomach fundus. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2007 ; 20 : 231-235.

**Gião MS, Pastana D, Faria A, Guimarães JT, Pintado ME, Calhau C, Azevedo I, Malcata FX.** Effects of extracts of selected medicinal plants upon hepatic oxidative stress. *J. Med. Food* 2010 ; 13(1) : 131-136.

**Gigon F.** Le gingembre, une épice contre la nausée. *Phytothérapie*, 2012 ; 10(2) : 87-91.

**Gilchrist M, Winyard PG, Benjamin N.** Dietary nitrate – Good or bad? *Nitric Oxide* 2010 ; 22 : 104-109.

**Green LC, Tannenbaum SR, Fox JG.** Nitrate in human and canine milk. *New Engl. J. Med.* 1982 ; 306 : 1367-1368.

**Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG.** Ginger – an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J. Med. Food* 2005 ; 8 : 125-132.

**Guetteridge JM.** Free radicals in disease processes : a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res.* 1993 ; 19 : 141-158.

**Habig WH, Pabst M., Jacobi WB.** The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974 ; 249 : 7130-7139.

**Halliwell B.** Free radicals and antioxidants : A personal view. *Nutr. Rev.* 1994 ; 52 : 253-265.

- Halliwell B.** Oxidative stress and neurodegeneration : where are we now? *J. Neurochem.* 2006 ; 97 : 1634-1658.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine.* 2<sup>ed</sup>. Clarendon Press : Oxford, 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4<sup>ed</sup>. Oxford University Press : Oxford, 2007.
- Han LK, Gong XJ, Kawano S, Saito M, Kimura Y, Okuda H.** Antiobesity actions of Zingiber officinale Roscoe. *Yakugaku Zasshi* 2005 ; 125 : 213-217.
- Harman D.** Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1956 ; 11 : 298-300.
- Hartmann A, Niess AM.** *Oxidative DNA damage in exercise.* (195-217). In : Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (Sen CK, Packer L, Hanninen O. Eds). Elsevier : Amsterdam, 2000.
- Hashimoto K, Satoh K, Murata P, Makino B, Sakakibara I, Kase Y.** Component of Zingiber officinale that improves the enhancement of small intestinal transport. *Planta Med.* 2002 ; 68 : 936-969.
- Hayes JD, Mclellan LI.** Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 1999 ; 31 : 273-300.
- Hayes JD, Pulford DJ.** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995 ; 30 : 445-600.
- Henretig FM, Gribetz B, Kearney T, Lacouture P, Lovejoy FH.** Interpretation of color change in blood with varying degree of methemoglobinemia. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1988 ; 26: 293-316.
- Hibbs JB.** Synthesis of nitric oxide from L-arginine-a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumor and antimicrobial activity. *Res. Immunol.* 1991 ; 142 : 565-569.
- Hill MJ.** *Nitrates and nitrites in food and water.* Ellis Horwood : London, 1991.
- Holtmann S, Clarke AH, Scherer H, Höhn M.** The anti-motion sickness mechanism of ginger. A comparative study with placebo and dimenhydrinate. *Acta Otolaryngol* 1989 ; 108 : 168-174.
- Honikel K.** The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 78 ; 2008 : 68-76.

**Houlot R.** Techniques d'histologie et de cytologie. Paris : Edition Maloine, 1984.

**Howie AF, Walker SW, Akesson B, Arthur JR, Beckett GJ.** Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: a potential regulator of thyroid-hormone synthesis. *Biochem. J.* 1995 ; 308 : 713-717.

**Hu ML, Rayner CK, Wu KL, Chuah SK, Tai WC, Chou YP, Chiu YC, Chiu KW, Hu TH.** Effect of ginger on gastric motility and symptoms of functional dyspepsia. *World J. Gastroenterol.* 2011 ; 17(1) : 105-110.

**Ippoushi K, Azuma K, Ito H, Horie H, Higasio H.** [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reaction. *Life sci.* 2003 ; 73 : 3427-3437.

**Ippoushi K, Ito H, Horie H, Azuma K.** Mechanism of inhibition of peroxynitrite-induced oxidation and nitration by [6]-gingerol. *Planta Medica* 2005 ; 71 : 563-566.

**Iqbal Z, Lateef M, Akhtar MS, Ghayur MN, Gilani AH.** *In vivo* anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.* 2006 ; 106 : 285-287.

**Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Ohmiya N, Niwa Y, Kadomatsu K, Goto H.** Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 ; 362 : 218-223.

**Jahoor F, Jackson A, Gazzard B, Pjilips G, Sharpstone D, Frazer ME, Heird W.** Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthetic rate. *Am. J. Physiol.* 1999 ; 276 : 205-211.

**Janick J.** *Horticultural Reviews*. Volume 39. John Wiley & Sons : New Jersey, 2012.

**Johnson D.** Perioperative methemoglobinemia. *Can. J. Anesth.* 2005 ; 52(7) : 665-668.

**Jolad SD, Lantz RC, Solyom AM, Chen GJ, Bates RB, Timmermann BN.** Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*) : composition and effects on LPS-induced PGE(2) production. *Phytochemistry* 2004 ; 65 : 1937-1954.

**Jublanc C, Bruckert E.** Hypothyroidism and cardiovascular disease : role of new risk factors and coagulation parameters. *Semin. Vasc. Med.* 2004 ; 4(2) : 145-151.

**Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Ieeuwenburgh C.** Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 2005 ; 19(3) : 419-421.

**Jung T, Bader N, Grune T.** Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007 ; 462 : 231-237.

**Kaplan LA, Rubaltelli FF, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Abramov A.** (1238-1241). Bilirubin. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan, LA. and AJ. Pesce (Eds.) The C.V. Mosby Company St Louis Toronto Princeton 1984.

**Kaur C, Kapoor HC.** Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2002 ; 37 : 153-161.

**Kehrer JP.** Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Critical Rev. Toxicol.* 1993 ; 23 : 21-48.

**Keng T, Privalle CT, Gilkeson GS, Weinberg JB.** Peroxynitrite formation and decreased catalase activity in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *Mol. Med.* 2000 ; 6 : 779-792.

**Knobeloch L, Salna B, Hogan A, Postale J, Anderson H.** Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ. Health Perspect.* 2000 ; 108 : 675-678.

**Koehler-Ramonatxo C.** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. Metabol.* 2006 ; 20 : 165-177.

**Kohen R, Nyska A.** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002 ; 30 : 620-650.

**Koller E.** *Traitement des pollutions industrielles « eau, air, déchets, sols, boues »*. 2<sup>ème</sup> édition. Dunod : Paris, 2009.

**Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundag B.** Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 2002 ; 46 : 27-32.

**Lacolley P.** *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. John Libbey Eurotext : Paris, 2007.

**Langner E, Greifenberg S, Gruenwald J.** Ginger : history and use. *Adv. Ther.* 1998, 15(1) : 25-44.

**Leaf CD, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** L-arginine is a precursor to nitrate biosynthesis in humans. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1989 ; 163 : 1032-1037.

- Lee SH, Cekanova M, Baek SJ.** Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mol. Carcinog.* 2008<sup>a</sup> ; 47(3) : 197-208.
- Lee SH, Seo EY, Kang NE, Kim WK.** [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J. Nutr. Biochem.* 2008<sup>b</sup> ; 19 : 313-319.
- Levine ME, Gillis MG, Koch SY, Voss AC, Stern RM, Koch KL.** Protein and Ginger for the treatment of chemotherapy-induced delayed nausea. *J. Altern. Complement. Med.* 2008 ; 14 (5) : 545-551.
- L'hirondel J, L'hirondel JL.** *Nitrate and Man : Toxic, Harmless or Beneficial ?* CABI Publishing : New York, 2002.
- Li X, Cobb CE, Hill KE, Burk RF, May JM.** Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 2001 ; 387 : 143-53.
- Li Y, Tran VH, Duke CC, Roufogalis BD.** Gingerols of *Zingiber officinale* Enhance Glucose Uptake by Increasing Cell Surface GLUT4 in Cultured L6 Myotubes. *Planta Med.* 2012 ; 78(14) : 1549-1555.
- Lien HC, Sun WM, Chen YH, Kim H, Hasler W, Owyang C.** Effects of ginger on motion sickness and gastric slow wave dysrhythmias induced by circularvection. *Am. J. Physiol.* 2003 ; 284 : 481-489.
- Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N.** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism : the case of rhizobia. *Res. Microbiol.* 2010 ; 161 : 453-463.
- Liu N, Huo G, Zhang L, Zhang X.** Effect of *Zingiber Officinale* Roscoe on lipid peroxidation in hyperlipidemia rats. *J. Hyg. Res.* 2003 ; 32 : 22-23.
- Macfadyen AJ, Reiter C, Zhuang Y, Beckman JS.** A novel superoxide dismutase-based trap for peroxynitrite used to detect entry of peroxynitrite into erythrocyte ghosts. *Chem. Res. Toxicol.* 1999 ; 12 : 223-229.
- Magee PN, Barnes JM.** Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.* 1967 ; 10 : 163-169.
- Maiorino M, Coassin M, Roveri A, Ursini F.** Microsomal lipid peroxidation : effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* 1989 ; 24 : 721-726.
- Mallikarjuna K, Sahitya Chetan P, Sathyavelu Reddy K, Rajendra W.** Ethanol toxicity: rehabilitation of hepatic antioxidant defense system with dietary ginger. *Phytoter.* 2008 ; 79(3) : 174-178.

**Mansouri A, Lurie AA.** Concise review methemoglobinemia. *Am. J. Hematol.* 1993 ; 42 : 7-12.

**Marc F, Davin A, Deglène-Benbrahim L, Ferrand C, Baccaunaud M, Fritsch P.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Med. Sci.* 2004 ; 20 : 458-463.

**Marco A, Quilchano C, Blaustein R.** Sensitivity to nitrate and nitrite in pond-breeding amphibians from the Pacific Northwest, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 1999 ; 18 (12) : 2836-2839.

**Mason CF.** *Biology of freshwater pollution.* 3<sup>ème</sup> édition. Longman Harlow : London, 1996.

**Meister A.** Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269(13) : 9397-9400.

**Mitchell H, Schonle H, Grindley H.** The origins of nitrate in urine. *J. Biol. Chem.* 1916 ; 24 : 461-490.

**Moltchanova E, Rytönen M, Kousa A, Taskinen O, Tuomilehto J, Karvonen M.** Zinc and nitrate in the ground water and the incidence of type 1 diabetes in Finland. *Diabetes Med.* 2004 ; 21 : 256-261.

**Moncada S, Palmer RMJ, Gryglewski RJ.** Mechanism of action of some inhibitors of endothelium derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986 ; 83 : 9164-9168.

**Murray RL.** Creatinine. (1261-1266). In : *Clinical Chemistry ; Theory, Analysis and Correlation.* Kaplan LA, Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton 1984<sup>a</sup>.

**Murray RL.** Aspartate aminotransferase. (1112-1116). In : *Clinical Chemistry ; Theory, Analysis and Correlation.* Kaplan LA., Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St Louis Toronto Princeton 1984<sup>b</sup>.

**Murray RL.** Alanine aminotransferase. (1088-1090). In : *Clinical Chemistry ; Theory, Analysis and Correlation.* Kaplan LA., Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton 1984<sup>c</sup>.

**Nageswara RM, Marschall SR.** Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 2007 ; 100 : 460-473.

**Nair Prabhakaran KP.** *The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger : The Invaluable Medicinal Spice Crops.* Newnes, Elsevier : Londres, 2013.

**Naito HK.** Cholesterol. (1194-1206). In: *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA, Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton 1984.

**Ness GC, Zhao Z, Lopez D.** Inhibitor of cholesterol biosynthesis increase hepatic low density lipoprotein receptor protein degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 ; 325 : 242-248.

**Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI.** Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychoph.* 2008 ; 21 : 1-26.

**Nicoll R, Henein MY.** Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a hot remedy for cardiovascular disease?. *Int. J. Cardiol.* 2009 ; 131 : 408-409.

**Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O.** Antibacterial effect of five Zingiberaceae essential oils. *Molecules.* 2007 ; 23 : 12 (8) : 2047-2060.

**Nyabyenda P.** *Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique: Cultures industrielles et d'exportation, cultures fruitières, cultures maraîchères.* Presses Agronomiques de Gembloux : Gembloux, 2006.

**Ogur R, Coskun O, Korkmaz A, Oter S, Yaren H, Hasde M.** High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of  $\alpha$ -tocopherol. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005 ; 20 : 161-166.

**Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Biochem.* 1979 ; 95 : 351-358.

**O'Mahony R, Al Khtheeri H, Weerasekera D, Fernando N, Vaira D, Holton J, Basset C.** Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.* 2005 ; 11 : 7499-7507.

**OMS 2003,** Nitrate and nitrite in Drinking-water « Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality ». World Health Organization (WHO), Rapport WHO/SDE/WSH/04.03/56.

**Onwuka FC, Erhabor O, Eteng MU, Umoh IB.** Protective effects of ginger toward cadmium-induced testes and kidney lipid peroxidation and hematological impairment in albino rats. *J. Med. Food* 2011 ; 14(7-8) : 817-821.

**Oommen C, Jain SR.** Ammonium nitrate : a promising rocket propellant oxidizer. *J. Hazard. Mater.* 1999 ; A67 : 253-281.

**Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, De Vries T, Brouns F, Hornstra G.** Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation : effects of fish oil and vitamin E. *J. Appl. Physiol.* 1997 ; 83 : 746-752.

**Ozgili G, Goli M, Simbar M.** Effects of ginger capsules on pregnancy, nausea, and vomiting. *J. Altern. Complement. Med.* 2009 ; 15(3) : 243-246.

**Ozturk L, Mansour B, Yuksel M, Yalcin AS, Celikoglu F, Gokhan N.** Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. *Clin. Chim. Acta* 2003 ; 332 : 83-88.

**Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA.** Inactivation of glutathione peroxidase by peroxy nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998 ; 349 : 1-6.

**Pak JH, Kim T, Kim MJ, Kim JY, Choi H, Kim SA, Tchah H.** Reduced expression of 1-cys peroxiredoxin in oxidative stress-induced cataracts. *Exp. Eye Res.* 2006 ; 82 : 899-906.

**Pannala AS, Rice-Evans C, Sampson J, Singh S.** Interaction of peroxy nitrite with carotenoids and tocopherols within low density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1998 ; 423 : 297-301.

**Parslow RC, McKinney PA, Law GR, Staines A, Williams R, Bodansky HJ.** Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetol.* 1997 ; 40 : 550-556.

**Patel K, Srinivavasan K.** Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albinos rats. *Aliment* 2000 ; 44 : 42-46.

**Patz J.** Public health risk assessment linked to climatic and ecological change. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2001 ; 7 : 1317-1327.

**Pearce EN.** Hypothyroidism and dyslipidemia: modern concepts and approaches. *Curr. Cardiol. Rep.* 2004 ; 6(6) : 451-456.

**Pesce A.** Lactate dehydrogenase. (1124-117, 438). In : *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation.* Kaplan LA., Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton 1984.

**Peterson A, Stoltze S.** Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. *Food Add. Contam.* 1999 ; 16 : 291-299.

**Phan P, Sohrabi A, Polosky A, Lindmark L, Hungerford DS, Lindmark L, Frondoza CG.** Ginger extract components suppress induction of chemokine expression in human synoviocytes. *J. Altern. Complement. Med.* 2005 ; 11 : 149-154.

**Pietta PG.** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000 ; 63 : 1035-1042.

**Pillai AK, Sharma KK, Gupta YK, Bakhshi S.** Anti-emetic effect of ginger powder versus placebo as an add-on therapy in children and young adults receiving high emetogenic chemotherapy. *Pediatr. Blood Cancer.* 2011 ; 56(2) : 234-238.

**Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutr. Clin. Metabol.* 2002 ; 16 : 233-239.

**Pincemail J, Degrune F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N, Defraigne JO.** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutr. Clin. Metabol.* 2007 ; (21)2 : 66-75.

**Powers SK, Sen CK.** *Physiological antioxidants and exercise training.* (221-242). In: *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* (Sen CK, Packer L, Hanninen O. Eds). Elsevier Science : Amsterdam, 2000.

**Qian QH, Yue W, Chen WH, Yang ZH, Liu ZT, Wang YX.** Effect of gingerol on substance P and NK1 receptor expression in a vomiting model of mink. *Chin. Med. J.* 2010 ; 123(4) : 478-484.

**Raat NJH, Shiva S, Gladwin MT.** Effects of nitrite on modulating ROS generation following ischemia and reperfusion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009 ; 61 : 339-350.

**Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S.** The anti-aggregating properties of vascular endothelium-interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987 ; 92 : 636-646.

**Ramade F.** *Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau.* Dunod : Paris, 1998.

**Ramade F.** *Eléments d'écologie : Ecologie appliquée.* 6<sup>ème</sup> édition, Dunod : Paris, 2005.

**Ramudu SK, Korivi M, Kesireddy N, Chen CY, Kuo CH, Kesireddy SR.** Ginger feeding protects against renal oxidative damage caused by alcohol consumption in rats. *J. Ren. Nutr.* 2011 ; 21 : 263-270.

**Reid G.** Association of sudden infant death syndrome with grossly deranged iron metabolism and nitric oxide overload. *Med. Hypotheses* 2000 ; 54 : 137-139.

**Rhode J, Fogoros S, Zick S, Wahl H, Griffith KA, Huang J, Liu JR.** Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 2007 ; 7(44) : 1-9.

**Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997 ; 2 : 152-159.

**Rodríguez-Estival J, Martínez-Haro M, Martín-Hernando MP, Mateo R.** Sub-chronic effects of nitrate in drinking water on red-legged partridge (*Alectoris rufa*): Oxidative stress and T-cell mediated immune function. *Environ. Res.* 2010 ; 110 : 469-475.

**Romero FJ, Bosch Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J.** Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.* 1998 ; 106 (5) : 1229-1234.

**Rong X, Peng G, Suzuki T, Yang Q, Yamahara J, Li Y.** A 35 -day gavage safety assessment of ginger in rats. *Regul. toxicol. Pharmacol.* 2009 ; 54 : 118-123.

**Ross IA.** Medicinal Plants of the world : chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Volume 3. Humana Press : New York, 2010.

**Rouse JD, Bishop CA, Struger J.** Nitrogen pollution : An assessment of its threat to amphibian survival. *Environ. Health Perspect.* 1999 ; 107 : 799-803.

**Roux D.** *Les nouvelles plantes qui soignent «comment utiliser efficacement plus de 50 plantes médicinales».* Editions Alpen : Monaco, 2005.

**Sadeq M, Moe CL, Attarassi B, Cherkaoui I, El Aouada R, Idrissi L.** Drinking water nitrate and prevalence of methemoglobinemia among infants and children aged 1-7 years in Moroccan areas. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2008 ; 211 : 546-554.

**Saul RL, Kabir SH, Cohen Z, Bruce WR, Archer MC.** Reevaluation of nitrate and nitrite levels in the human intestine. *Cancer Res.* 1981 ; 41 : 2280-2283.

**Schultz A.** Uric Acid. (1261-1266). In : *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation.* Kaplan LA, Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton 1984.

**Schwertner HA, Rios DC.** High-performance liquid chromatographic analysis of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol in ginger-containing dietary supplements, spices, teas, and beverages. *J. Chromatography B* 2007 ; 856 ; 41-47.

**Shahidul-Islam M, Choi H.** Comparative effects of dietary Ginger (*Zingiber officinale*) and Garlic (*Allium sativum*) investigated in a type 2 diabetes model of rats. *J. Med. Food* 2008 ; 11(1) : 152-159.

**Shanmugam KR, Ramakrishna CH, Mallikarjuna K, Sathyavelu Reddy K.** Protective effect of ginger in alcohol-induced renal damage and antioxidant enzymes in male albino rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2010 ; 4 : 143-149.

**Shanmugam KR, Mallikarjuna K, Nishanth K, Kuo CH, Reddy KS.** Protective effect of dietary ginger on antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues. *Food Chem.* 2011 ; 124 : 1436-1442.

**Sharma B, Ahlert RC.** Nitrification and nitrogen removal. *Water Res* 1977 ; 11 : 897-925.

**Sharma P, Singh R.** Dichlorvos and lindane induced oxidative stress in rat brain: protective effects of ginger. *Pharmacognosy Res.* 2012 ; 4(1) : 27-32.

**Shi H, Noguchi N, Xu Y, Niki E.** Formation of phospholipid hydroperoxides and its inhibition by alphatocopherol in rat brain synaptosomes induced by peroxyxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 ; 257 : 651-656.

**Shimodo H, Shan SJ, Tanaka J, Seki A, Seo JW, Kasajima N, Tamura S, Ke Y, Murakami N.** Anti-inflammatory properties of red ginger (*zingiber officinale var. Ruba*) extract and suppression of nitric oxide production by its constituents. *J. Med. Food.* 2010 ; 13(1) : 156-162.

**Shin SG, Kim JY, Chung HY, Jeong JC.** Zingerone as an antioxidant against peroxyxynitrite. *J. Agric. Food Chem.* 2005 ; 53(19) : 7617-7622.

**Shukla Y, Singh M.** Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chem. Toxicol.* 2007; 45, 683-690.

**Sies H.** Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med.* 1993 ; 14(3) : 313-323.

**Singh G, Kapoor IPS, Singh P, De Heluani CS, De Lampasona MP, Catalan CAN.** Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on Essential oil and oleoresins of *zingiber officinale*. *Food Chem. Toxicol.* 2008 ; 46 : 3295-3302.

**Sorg O.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *C. R. Biol.* 2004 ; 327 : 649-662.

**Spiridonov NA.** Mechanisms of Action of Herbal Cholagogues. *Spiridonov Med. Aromat. Plants* 2012 ; 1(5) : 1-4.

**Srinivasan K, Sambaiah K.** The effect of spices on cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1991 ; 61 : 364-369.

**Stark G.** Functional consequences of oxidative membrane damage. *J. Membrane Biol.* 2005 ; 205 : 1-16.

**Stellman JM.** *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail.* International Labour Organization : Genève, 2000.

**Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S.** Antioxidant activity of a ginger extracts (*Zingiber officinale*). *Food chem.* 2007 ; 102 : 764-770.

**Terada LS, Willingham IR, Rosandich ME, Leff JA, Kindt GW, Repine JE.** Generation of superoxide anion by brain endothelial cell xanthine oxidase. *J. Cell. Physiol.* 1991 ; 148(2) : 191-196.

**Testud F.** Inorganic fertilizers. *EMC-toxicol. Pathol.* 2004 ; 1 : 21-28.

**Thomson M, Al-Qattan KK, Al-Sawan SM, Alnaqeeb MA, Khan I, Ali M.** The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acid* 2002 ; 67 : 475-478.

**Tu L, Jeng WC, Hung LL, Tsung YL, Yee CT, Shao-Liang C, Sheng-Wei L, Jung-Chih H, Lien-Tai C.** Stabilization and spheroidization of ammonium nitrate : Co-crystallization with crown ethers and spherical crystallization by solvent screening. *Chem. Eng. J.* 2013 ; 225 : 809-817.

**Turek B, Hlavsova D, Tucek J, Waldman J, Cerna J.** The fate of nitrates and nitrites in the organism. *IARC Sci. Pub.* 1980 ; 31 : 625- 632.

**Turrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 2003 ; 552 : 335-344.

**Umbreit J.** Methemoglobin-it's not just blue : a concise review. *Am. J. Hematol.* 2007 ; 82 : 134-144.

**Uperti KK, Das M, Kuman A, Singh GB, Khanna SK.** Biochemical toxicology of agremoue oil IV short term oral feeding response in rats. *Toxicol.* 1989 ; 58 : 285-289.

**Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007 ; 39 : 44-84.

**Vaubourdolle M.** Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques. Wolters Kluwer : paris, 2007.

**Volkmer BG, Ernst B, Simon J, Kuefer R, Bartsch G, Bach D, Gschwend JE.** Influence of nitrate levels in drinking water on urological malignancies : a community-based cohort study. *BJU Int.* 2005 ; 95 : 972-976.

**Wagner DA, Schultz DS, Deen WM, Young VR, Tannenbaum SR.** Metabolic fate of an oral dose of <sup>15</sup>N-labeled nitrate in humans : effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res.* 1983 ; 43 : 1921-1925.

**Wallace DC, Brown MD, Melov S, Graham B, Lott M.** Mitochondrial biology, degenerative disease and aging. *Biofactors* 1998 ; 7 : 187-190.

**Ward MH, Cantor KP, Riley D, Merkle S, Lynch CF.** Nitrate in public water supplies and risk of bladder cancer. *Epidemiol.* 2003 ; 14 : 183-190.

**Ward MH, Heineman EF, Mc Comb RD, Weisenburger DD.** Drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite and risk of glioma. *J Occup. Environ. Med.* 2005 ; 47 : 1260-1267.

**Weckbercker G, Cory JG.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-dependent mouse leukaemia L 1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* 1988 ; 40 : 257-264.

**Wenger C, et al.** Alkaline phosphatase. (1094-1098). In : *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation.* Kaplan LA., Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton 1984.

**Wetzel RG.** *Limnology « Lake and river systems ».* 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press : New York. 2001.

**Weyer PJ, Cerhan JR, Kross BC, Hallberg GR, Kantamneni J, Breuer G, Jones M, Zheng W, Lynch CF.** Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women : the Iowa Women's Health Study. *Epidemiol.* 2001 ; 12 : 327-338.

**Williams EM, Eddy FB.** Effects of nitrite on the embryonic development of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1989 ; 46(10) : 1726-1729.

**Witter JP, Gatley SJ, Balish E.** Distribution of nitrogen-13 from labeled nitrate ( $^{13}\text{NO}_3$ ) in humans and rats. *Science* 1979 ; 204 : 411-413.

**Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD.** Methemoglobinemia : etiology, pharmacology, and clinical management. *Ann. Emerg. Med.* 1999 ; 34 : 646-656.

**Wu KL, Rayner CK, Chuah SK, Changchien CS, Lu SN, Chiu YC, Chiu KW, Lee CM.** Effects of ginger on gastric emptying and motility in healthy humans. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008 ; 20(5) : 436-440.

**Yamahara J, Rong HQ, Iwamoto M, Kobayashi G, Matsuda H, Fujimura H.** Active components of ginger exhibiting antiserotinergetic action. *Phytother. Res.* 1989 ; 3 : 70-71.

**Yu BP.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994 ; 74 : 136-162.

**Zang LY, Stone K, Pryor WA.** Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic. Biol. Med.* 1995 ; 19 : 161-167.

**Zeegers MP, Selen RF, Kleinjans JC, Goldbohm RA, Van den Brandt PA.** Nitrate intake does not influence bladder cancer risk : the Netherlands cohort study. *Environ. Health Perspect.* 2006 ; 114 : 1527-1531.

**Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ.** Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 2002 ; 33 : 337-349.

---

*ANNEXES*

---

## Fiches techniques Kit Spinréact (Espagne)

### Bilan rénal sanguin

#### ❖ Mesure de l'urée

#### Les réactifs

<b>R 1 tampon</b>	Phosphate pH 6.7	50	mmol/l
	EDTA	2	mmol/l
	Salicylate de sodium	400	mmol/l
	Nitroprusside de sodium	10	mmol/l
<b>R 2 NaClO</b>	Hypochlorite de sodium	140	mmol/l
	Hydroxyde de sodium	150	mmol/l
<b>R 3 Enzymes</b>	Uréase	30000	U/l
<b>Urée calibrant</b>	Urée aqueux standard	50	mg/dl

#### Préparation du réactif de travail (RT)

- ✓ Dissoudre un comprimé R 3 dans la fiole R 1, mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.
- ✓ Le réactif R 2 est prêt pour l'usage direct.

#### Mode opératoire

		<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>RT</b>	<b>(ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard</b>	<b>(µl)</b>	--	10	--
<b>Echantillon</b>	<b>(µl)</b>	--	--	10
Mélanger et incuber pendant 5 min à 37°C				
<b>R 2</b>	<b>(ml)</b>	1.0	1.0	1.0
Mélanger et incuber pendant 5 min à 37°C				

- ✓ Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 580 nm contre le blanc, la couleur est stable après 30 min à une température allant de 15 à 25°C.

Calcul

$$\text{Concentration de l'urée (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 50 \text{ (standard conc.)}$$

## ❖ Mesure de la créatinine

## Les réactifs

R 1	Acide picrique	17.5	mmol/l
R 2	Hydroxyde de sodium	0.29	mol/l
Créatinine calibrant	Créatinine aqueux standard	2	mg/dl

Préparation du réactif de travail (RT) : mélanger à parts égales R 1 et R 2.

## Mode opératoire

		Blanc	Standard	Echantillon
RT	(ml)	1.0	1.0	1.0
Standard	( $\mu$ l)	--	100	--
Echantillon	( $\mu$ l)	--	--	100

- ✓ Mélanger et déclencher le chronomètre.
- ✓ Lire la densité optique ( $A_1$ ) après 30 secondes à 492 nm et la densité optique ( $A_2$ ) après 90 secondes.
- ✓ Calculer :  $\Delta A = \Delta A_2 - \Delta A_1$ . (La concentration du standard = 2 mg/dl).

Calcule

$$\text{Concentration de la créatinine (mg / dl)} = \frac{\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}}{\Delta A \text{ standard} - \Delta A \text{ blanc}} \times 2$$

## ❖ Mesure de l'acide urique

*Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	Phosphate pH 7.4	50	mmol/l
	2-4 Dichlorophenol sulphonate (DCPS)	4	mmol/l
<b>R 2 enzymes</b>	Uricase	60	U/l
	Peroxydase (POD)	660	U/l
	Ascorbate oxidase	200	U/l
	4-Aminophenazone (4-AP)	1	mmol/l
<b>Acide urique calibrant</b>	L'acide urique aqueux standard	6	mg/dl

*Préparation du réactif de travail (RT)*

- ✓ Dissoudre le contenu de R2 dans une fiole de R1.
- ✓ Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

*Mode opératoire*

		<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>RT</b>	<b>(ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard</b>	<b>(µl)</b>	--	25	--
<b>Echantillon</b>	<b>(µl)</b>	--	--	25

- ✓ Agiter et incuber pendant 5 min à 37° C.
- ✓ Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 520 nm contre le blanc.

Calcule 
$$\text{Concentration de l'acide urique (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 6 \text{ (standard conc.)}$$

## ❖ Bilan lipidique

## Mesure du cholestérol

## Les réactifs

<b>R 1 tampon</b>	PIPES pH 6.9	90	mmol/l
	Phénol	26	mmol/l
<b>R 2 enzymes</b>	Cholestérol estérase (CHE)	300	U/l
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300	U/l
	Peroxydase (POD)	1250	mmol/l
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.4	mmol/l
<b>Cholestérol calibrant</b>	Cholestérol aqueux standard	200	mg/dl

## Préparation du réactif de travail (RT)

- ✓ Dissoudre le contenu de R2 dans une fiole de R1.
- ✓ Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

## Mode opératoire

		Blanc	Standard	Echantillon
<b>RT</b>	<b>(ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard</b>	<b>(µl)</b>	--	10	--
<b>Echantillon</b>	<b>(µl)</b>	--	--	10

- ✓ Agiter et incuber pendant 5 min à 37°C.
- ✓ Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 505 nm contre le blanc.

Calcule

$$\text{Concentration du cholestérol (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 200 \text{ (standard conc.)}$$

❖ **Mesure des triglycérides***Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	GOOD pH 7.5	50	mmol/l
	P-chlorophénol	2	mmol/l
<b>R 2 enzymes</b>	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000	U/l
	Glycérol kinase (GK)	500	U/l
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500	U/l
	Peroxydase (POD)	440	U/l
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.1	mmol/l
	ATP	0.1	mmol/l
<b>Triglycérides calibrant</b>	triglycérides aqueux standard	200	mg/dl

*Préparation du réactif de travail (RT)*

- ✓ Dissoudre le contenu de R2 dans une fiole de R1.
- ✓ Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

*Mode opératoire*

		<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>RT</b>	<b>(ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard</b>	<b>(µl)</b>	--	10	--
<b>Echantillon</b>	<b>(µl)</b>	--	--	10

- ✓ Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37° C.
- ✓ Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 505 nm contre le blanc.

Calcule 
$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ standard}} \times 200 \text{ (standard conc.)}$$

❖ **Mesure des lipides totaux***Les réactifs*

<b>Réactif principal (R)</b>	Phosphovainilline	235	mmol/l
<b>Lipides totaux calibrant</b>	Lipides totaux aqueux standards	750	mg/dl
<b>Réactif optimal</b>	Acide sulfurique H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	80	%

Les réactifs sont prêts pour l'usage direct.

*Mode opératoire*

		<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>(ml)</b>	2.5	2.5
<b>Standard</b>	<b>(µl)</b>	100	--
<b>Echantillon</b>	<b>(µl)</b>	--	100

- ✓ Mélanger et incuber les tubes préparés dans un bain marie pendant 10 min à 100°C.
- ✓ Refroidissez dans la glace et transférez dans une cuvette.

	<b>Blanc</b>	<b>Standard</b>	<b>Echantillon</b>
<b>R (ml)</b>	1.0	1.0	1.0
<b>Standard de l'acide condensé (µl)</b>	--	50	--
<b>Echantillon d'acide condensé (µl)</b>	--	--	50

- ✓ Secouer entièrement les tubes en utilisant un agitateur mécanique.
- ✓ Incuber pendant 15 min à 37°C.
- ✓ Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et du standard à 520 nm contre le blanc, la couleur est stable après 1 heure.

Calcule **Concentration des lipides totaux (mg/dl)** = 
$$\frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 750 \text{ (standard conc.)}$$

**Bilan hépatique**❖ **Mesure de l'aspartate aminotransférase (ASAT / TGO)***Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	Tris pH 7.8	80	mmol/l
	L-aspartate	200	mmol/l
<b>R 2 substrat</b>	NADH	0.18	mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800	U/l
	Malate déshydrogénase (MDH)	600	U/l
	$\alpha$ -cétoglutarate	12	mmol/l

*Préparation du réactif de travail (RT) :* dissoudre un comprimé de R 2 dans une fiole de R 1.

*Mode opératoire*

<b>Réactif de travail</b>	<b>(ml)</b>	1.0
<b>Echantillon</b>	<b>(<math>\mu</math>l)</b>	100
<b>Température</b>	<b>(°C)</b>	37

- ✓ Mélanger et incuber pendant une minute.
- ✓ Lire l'absorbance initiale à 340 nm et démarrer le chronomètre simultanément.
- ✓ Lire de nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

Calcule

$$\text{ASAT (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

❖ **Mesure de l'alanine aminotransférase (ALAT/GPT)***Les réactifs*

<b>R 1 tampon</b>	Tris pH 7.8	100	mmol/l
	L-alanine	500	mmol/l
<b>R 2 substrat</b>	NADH	0.18	mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200	U/l
	$\alpha$ -cétoglutarate	15	mmol/l

**Préparation du réactif de travail (RT) :** Dissoudre un comprimé de R2 dans le flacon de R1.

### Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (µl)	100
Température (°C)	37

- ✓ Mélanger et incuber pendant une minute.
- ✓ Lire l'absorbance initiale à 340 nm et démarrer le chronomètre simultanément.
- ✓ Lire de nouveau après 1,2 et 3 minutes.

Calcule

$$\text{ALAT (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

### ❖ Mesure de la phosphatase alcaline (PAL)

#### Les réactifs

R 1 tampon	Diethanolamine (DEA) pH 10.4	1	mmol/l
	Chloride de magnésium	0.5	mmol/l
R 2 Substrat	p-Nitrophenylphosphate (pNPP)	10	mmol/l

### Préparation du réactif de travail (RT)

- ✓ Dissoudre un comprimé de R2 dans une fiole de R1.
- ✓ Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C, ou 5 jours à 15-25°C.

### Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.2
Echantillon (µl)	20
Température (°C)	37

- ✓ Mélanger et incuber une minute
- ✓ Lire l'absorbance initiale à 405 nm et démarrer le chronomètre simultanément.
- ✓ Lire de nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

Calcule

$$\text{PAL (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 3300$$

### Mesure du lactate déshydrogénase (LDH)

#### Les réactifs

<b>R 1 tampon</b>	Imidazol	65	mmol/l
	Pyruvate	0.6	mmol/l
<b>R 2 Substrat</b>	NADH	0.18	mmol/l

#### Préparation du réactif de travail (RT)

- ✓ Dissoudre un comprimé de R2 dans une fiole de R1.
- ✓ Mélanger doucement jusqu'à la dissolution complète.

#### Mode opératoire

<b>Réactif de travail</b>	<b>(ml)</b>	3
<b>Echantillon</b>	<b>(µl)</b>	50
<b>Température</b>	<b>(°C)</b>	37

- ✓ Mélanger et incuber une minute.
- ✓ Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minute.

Calcule

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 9690$$

## Mesure de la bilirubine

### Les réactifs

R 1 (D)	Acide sulfonique	30	mmol/l
	Acide hydro chlorhydrique	150	mmol/l
R 2 (T)	Acide sulfonique	30	mmol/l
	Acide hydro chlorhydrique	50	mmol/l
	Dimethyl sulfoxyde (DMSO)	7	mol/l
R 3	Nitrite de sodium	29	mmol/l
Facultatif	Bilirubine standard	Ref : 1002250	

*Préparation du réactif de travail* : Les réactifs sont prêts à l'emploi

### Mode opératoire

		Blanc	B totale	Blanc	B directe
R 1 (D)	(ml)	--	--	1.5	1.5
R 2 (T)	(ml)	1.5	1.5	--	--
R 3	(µl)	--	50	--	50
Echantillon/ Standard	(µl)	100	100	100	100

- ✓ Mélanger et incuber pendant 15 minutes à 15-25°C.
- ✓ Mesurer l'absorbance (A) à 555 nm.

### Calcul

$$\text{Bilirubine (mg/dl)} = ((A) \text{ échantillon} - (A) \text{ échantillon blanc}) \times \text{Facteur}$$

$$\text{Facteur} = \frac{\text{Concentration du standard}}{(A) \text{ Standard} - (A) \text{ Blanc}}$$

$$\text{Facteur théorique} \left\{ \begin{array}{l} \text{Bilirubine totale} = 19.1 \\ \text{Bilirubine directe} = 14 \end{array} \right.$$

---

## Préparation des solutions

### ❖ Dosage du glutathion :

#### ✓ Solution EDTA (0,02 M) :

Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750ml d'eau distillée.

#### ✓ Solution DTNB (0,01 M) :

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

#### ✓ Solution d'acide salicylique (0,25 %) :

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

### ❖ Dosage du MDA :

#### ✓ Solution TCA (20 %) :

Dissoudre 20 g de TCA dans 100 ml d'eau distillée

#### ✓ Solution Tris :

Dissoudre 0,15 g de tris dans 50 ml d'eau distillée

#### ✓ Solution TBA (0,67 %) :

Dissoudre 0,33 g de TBA dans 50 ml de la solution tris

### ❖ Dosage de la glutathion peroxydase (GPx) :

#### ✓ Solution TBS : Tris (50 mM, NaCl (150 mM) :

Dissoudre 8,775g NaCl dans 1l d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1l par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant HCl ou NaOH.

#### ✓ Solution du GSH (0.1 mM) :

Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.

#### ✓ Solution TCA (1 %) :

Dissoudre 1g TCA dans 100 ml d'eau distillée.

#### ✓ Solution DTNB (1,0 mM) :

Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

### ❖ Dosage de la glutathion-S-transférase (GST) :

#### ✓ Solution CDNB (0,02 M) :

Dissoudre 202,55 mg CDNB dans 50 ml d'éthanol absolu.

✓ Solution GSH (0,1 M) :

Dissoudre 153,65 mg GSH dans 50 ml d'eau distillée.

❖ **Dosage du catalase (CAT) :**

✓ Tampon phosphate (0,1M) :

Solution (A) : dissoudre 35,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans 1 l d'eau distillée

Solution (B) : dissoudre 13,8 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 1 l d'eau distillée

Mélanger 61,5 ml de la solution (A) et 438,5 ml de la solution (B), et ajouter 21,39 g de saccharose.

❖ **Dosage des protéines par la méthode de Bradford :**

✓ Solution BSA (1 mg/ml) :

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

✓ Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95 %). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85 %) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 l de solution).

Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4 °C et à l'abri de la lumière.

❖ **Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines :**

<b>BSA</b>	<b>ml</b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
<b>DO à 595</b>	<b>nm</b>	0	0,05	0,1	0,15	0,20	0,25

❖ **Réalisation de la gamme d'étalonnage du MDA**

<b>1,1,3,3-tetraoxypropane</b>	<b>ml</b>	0	20	40	80	160	200
<b>DO à 530</b>	<b>nm</b>	0	0.111	0.2	0.4	0.743	0.935

❖ **Préparation du Bouin alcoolique (100 ml) :**

Mélanger :

- ✓ 45 ml de solution d'acide picrique 1 % dans de l'éthanol (95 %)
- ✓ 26 ml de Formol.
- ✓ 07 ml d'acide acétique.
- ✓ 22 ml d'eau distillée.